

# **cDNA-Klonierung, Mutagenese und Lokalisation der Isobutyrophenon-Synthase aus *Hypericum perforatum***

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Ines Belhadj Ep Haddad  
aus Zeramdine (Monastir) / Tunesien

1. Referent:	Professor Dr. Ludger Beerhues
2. Referent:	apl. Professor Dr. Robert Hänsch
eingereicht am:	19.08.2013
mündliche Prüfung (Disputation) am:	21.11.2013

Druckjahr 2014

### **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Tagungsbeitrag in Form einer Posterpräsentation**

Ines Belhadj, Mariam M Gaid, Ludger Beerhues; Hyperforin biosynthesis: cDNA cloning of isobutyrophenone synthase. 58<sup>th</sup> International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product research, Berlin, Germany, 29<sup>th</sup> August- 2<sup>nd</sup> September 2010.

Ines Belhadj, Mariam M Gaid, Ludger Beerhues; Hyperforin biosynthesis: cDNA cloning of isobutyrophenone synthase. Jahrestagung 2010 der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft. Braunschweig, Germany, 4-7<sup>th</sup> October 2010.

### **Tagungsbeitrag in Form eines Kurzvortrags**

Ines Belhadj, Ludger Beerhues; Charakterisierung und Mutagenese von Polyketid-Synthasen aus *Hypericum*-Spezies. 4<sup>th</sup> Annual Hypericum Meeting, Graz, Österreich, 23-24<sup>th</sup> Oktober 2011.

## Danksagung

Ich danke herzlichst meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. Ludger Beerhues, für die Vergabe des interessanten Promotionsthemas und die sehr freundliche Unterstützung sowie das Interesse am Fortgang der Arbeit und die regen Diskussionen zu diesem Thema.

Ich danke Dr. Rainer Lindigkeit für die Soforthilfe bei PC-Problemen. Dr. Till Beuerle danke ich für seinen wertvollen Rat bei allen analytischen Problemen.

Danken möchte ich Dr. Mariam Gaid für die praktische Hilfe im Labor sowie die permanente Hilfsbereitschaft während dieser Arbeit.

Bei Prof. Dr. Benye Liu bedanke ich mich für seine hilfreichen Hinweise und Ideen zur Durchführung der Arbeit.

Danken möchte ich Frau Ines Rahaus für die unermüdliche Sequenzierung und nützlichen Ratschläge.

Allen Mitarbeitern des IPB danke ich für die tolle Arbeitsatmosphäre und den herzlichen zwischenmenschlichen Umgang. Besonders erwähnt seien: Dr. Asya Swiddan, Dr. Cornelia Chizzali, Dr. Noemi Tocci, Dr. Mohammed Khalil und Dr. William Meva Meva.

Für das Korrekturlesen dieser Arbeit danke ich Dennis Reckwell.

Mein spezieller Dank gilt meinem Mann *Ouahid* für seine permanente Unterstützung, seine Engelsgeduld und Liebe, die er mir entgegen brachten.

Herzlich danken möchte ich meinem kleinen Löwe *Hayder*.

Ich danke meiner Familie für ungezählte aufmunternde Worte, viel Verständnis und Unterstützung während des gesamten Studiums und der Promotion.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Johanniskraut.....	1
1.1.1 Name und Geschichte.....	1
1.1.2 Botanik.....	2
1.2 Inhaltsstoffe.....	3
1.2.1 Naphthodianthrone.....	3
1.2.2 Hyperforin.....	4
1.2.3 Flavonoide.....	5
1.2.4 Xanthone.....	7
1.2.5 Weitere Inhaltsstoffe.....	8
1.3 Johanniskraut bei der Behandlung von Depression.....	9
1.3.1 Depression.....	9
1.3.2 Johanniskrautextrakt.....	10
1.4 <i>Hypericum calycinum</i> .....	12
1.5 Biosynthese des Hyperforins.....	13
1.6 Sekundäre Pflanzenstoffe.....	15
1.7 Polyketidsynthasen.....	17
1.7.1 Struktur und Mechanismus der Polyketidsynthasen vom Typ III.....	18
1.7.2 Beispiele für Typ III Polyketidsynthasen.....	19
1.7.2.1 Chalkon-Synthase und Stilben-Synthase.....	19
1.7.2.2 Benzophenon-Synthase und Biphenyl-Synthase.....	21
1.7.2.3 Valerophenon-Synthase.....	23
1.7.2.4 Isobutyrophenon-Synthase.....	24
1.8 Zielsetzung.....	25
<b>2 Material.....</b>	<b>26</b>
2.1 Pflanzenmaterial.....	26
2.1.1 Intakte Pflanzen.....	26
2.1.2 Zellkulturen von <i>H. calycinum</i> .....	26
2.1.3 Zellkulturen von <i>Hypericum perforatum</i> subsp. <i>angustifolium</i> .....	26

2.1.4 Kultivierung von Kallus- und Zellsuspensionskulturen.....	27
2.2 Chemikalien, Nährmedien, Lösungen und Puffer.....	28
2.2.1 Chemikalien, biochemische und molekularbiologische Reagenzien.....	28
2.2.2 Nährmedien für Pflanzengewebekulturen.....	29
2.3 Lösungen und Puffer für biochemische Untersuchungen.....	31
2.4 Lösungen, Puffer und Nährmedien für die Molekularbiologie.....	33
2.4.1 Medien zur Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	33
2.4.2 Lösungen für die Transformation und Selektion von <i>E. coli</i> .....	33
2.4.3 Antibiotika.....	33
2.4.4 Puffer und Lösungen für die DNA-Gelelektrophorese.....	33
2.4.5 Puffer für die Plasmidisolierung.....	34
2.4.6 Puffer für die <i>in situ</i> -Hybridisierung.....	34
2.5 Enzyme.....	35
2.6 Kits.....	35
2.7 Bakterienstämme und Plasmide.....	36
2.7.1 Bakterienstämme.....	36
2.7.2 Vektoren.....	36
2.8 Nukleotide.....	36
2.9 Oligonukleotide.....	36
2.9.1 SMART II-RACE Primer.....	36
2.9.2 Degenerierte Primer für PKS.....	37
2.9.3 Primer um HpBUS zu amplifizieren.....	37
2.9.4 Primer um 5'ORF1 zu amplifizieren.....	37
2.9.5 Primer um HcPKS1 zu amplifizieren.....	37
2.9.6 Überexpressionsprimer.....	38
2.9.7 Vektor-Primer.....	38
2.9.8 TATA Box degenerierte Primer.....	38
2.9.9 Mutationsprimer.....	38
2.9.10 Primer für <i>in situ</i> -Hybridisierung.....	39
2.10 Geräte.....	39

<b>3 Methoden.....</b>	<b>40</b>
3.1 Molekularbiologische Methoden.....	40
3.1.1 Anzucht und Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	40
3.1.2 Design von Oligonukleotiden .....	40
3.1.3 Einbau von Restriktionsschnittstellen in Primer.....	40
3.1.4 Isolierung von Gesamt-RNA.....	41
3.1.5 Isolierung von genomischer DNA.....	41
3.1.6 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäure-Lösungen.....	41
3.1.7 Reverse Transkription (RT).....	42
3.1.7.1 cDNA-Synthese mittels M-MuLV Reverse Transcriptase .....	42
3.1.7.2 cDNA-Synthese mittels PrimeScript™ Reverse Transcriptase .....	43
3.1.8 Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction; PCR).....	44
3.1.8.1 Touch-down-PCR.....	47
3.1.8.2 Nested PCR.....	47
3.1.8.3 RACE –PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends).....	47
3.1.8.4 Semi-Nested PCR mit TATA-Box Primer.....	48
3.1.8.5 Mutations-PCR.....	49
3.1.9 Agarose- Gelelektrophorese.....	50
3.1.9.1 Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	50
3.1.10 Herstellung eines T-Überhangvektors.....	51
3.1.11 Restriktion mittels Typ-II-Endonukleasen.....	51
3.1.12 Ligation mittels T4.....	53
3.1.13 Reinigung von PCR.....	53
3.1.14 Klonierung in das pGEM-T Easy Vektor System.....	54
3.1.15 Klonierung in das pRSET B Vektor System.....	54
3.1.16 CaCl <sub>2</sub> -vermittelte Transformation von <i>E. coli</i> .....	54
3.1.16.1 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> .....	54
3.1.16.2 Transformation von <i>E. coli</i> DH5a.....	55
3.1.16.3 Transformation von <i>E. coli</i> in BL21(DE3)pLysS.....	55
3.1.16.4 Insertionskontrolle.....	56

3.1.17 Plasmidisolation aus <i>E. coli</i> mit Minipräparation.....	56
3.1.18 DNA-Sequenzierung.....	57
3.1.18.1 Probenaufbereitung.....	57
3.1.18.2 Sequenziergel.....	58
3.1.18.3 DNA-Sequenzierung bei MWG (mwg-biotech) und GATC.....	59
3.1.18.4 Auswertung der Sequenzierdaten.....	59
3.1.19 Heterologe Expression.....	59
3.1.19.1 Zellaufschluss.....	60
3.1.20 <i>in situ</i> -Hybridisierung.....	60
3.1.20.1 Synthese von DIG-markierten RNS-Sonden ( <i>in vitro</i> -Transkription).....	60
3.1.20.2 <i>in situ</i> -Hybridisierung (ISH).....	62
3.2 Analytische und biochemische Methoden .....	63
3.2.1 Affinitätschromatographie.....	63
3.2.1.1 Reinigung über Bindung an Ni-NTA-Agarose.....	64
3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	64
3.2.3 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	65
3.2.3.1 Herstellung des Gels und Probenvorbereitung.....	65
3.2.3.2 Elektrophorese und Detektion der Proteinbanden.....	65
3.2.3.3 Bestimmung des Molekulargewichts.....	65
3.2.4 Charakterisierung der überexprimierten Proteine.....	66
3.2.4.1 Bestimmung von pH-, Temperatur- und Zeit-Optima.....	66
3.2.4.2 Untersuchung der Substratspezifität.....	66
3.2.4.3 Bestimmung von kinetischen Daten.....	66
3.2.5 High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC).....	67
3.2.6 HPLC-MS.....	69
3.2.7 Elizitierung von Zellsuspensionskulturen.....	69
3.2.7.1 Chitosan Vorbereitung.....	69
3.2.8 Enzym-Extraktion.....	70
3.2.9 Entfernung von niedermolekularen Verbindungen.....	70
3.2.10 Polyketid-Synthase-Ansätze.....	70



<b>4 Ergebnisse.....</b>	<b>72</b>
4.1 Isolierung von Gesamt-RNA.....	72
4.2 Design von degenerierten Primern.....	72
4.3 Klonierung von BUS-Transkript aus <i>H. perforatum</i> .....	73
4.3.1 Amplifikation eines HpBUS cDNA-Fragments.....	73
4.3.2 Gewinnung der vollständigen HpBUS-cDNA.....	74
4.4 Amplifikation weiterer PKS-Fragmente mit degenerierten Primern.....	75
4.4.1 Klonierung und Sequenzierung der gewonnenen Fragmente.....	79
4.4.2 Sequenz-Analyse der gewonnenen cDNA-Fragmente.....	80
4.5 Korrektur des 5'-Endes von HcORF1.....	81
4.6 Gewinnung der vollständigen HcPKS1-cDNA.....	82
4.7 Amplifikation von ORFs für die heterologe Expression.....	83
4.8 Heterologe Expression der klonierten PKS.....	85
4.8.1 Kontrolle der heterologen Expression.....	85
4.9 Test auf enzymatische Aktivität.....	87
4.9.1 Überprüfung der Aktivität der HcPKS1 und des HcORF1-Proteins.....	87
4.9.2 Überprüfung der Aktivität der HpBUS.....	87
4.10 Charakterisierung der rekombinanten HpBUS.....	89
4.10.1 Bestimmung des pH-Optimums.....	89
4.10.2 Bestimmung des Temperatur-und Zeitoptimums.....	90
4.10.3 Substratspezifität.....	91
4.10.4 Enzymkinetik.....	94
4.11 Aktivitäten verschiedener BPS-Enzyme in Gegenwart von [2- <sup>14</sup> C] Malonyl-CoA.....	97
4.12 Mutagenese der HpBUS.....	98
4.13 Bestimmung der Enzymaktivitäten der HpBUS-Mutanten.....	100
4.13.1 Einzelmutationen der HpBUS in Richtung der anderen BPS.....	101
4.13.2 Einzelmutation der HpBUS unabhängig von anderen BPS.....	103
4.13.3 Doppelmutationen der HpBUS in Richtung der anderen BPS.....	103
4.13.4 Tripel-Mutation der HpBUS in Richtung der anderen BPS.....	106
4.14 Charakterisierung der Doppel-Mutante I176V/T277P.....	107

4.14.1 Bestimmung von pH- und Temperaturoptimum sowie Zeitabhängigkeit.....	107
4.14.2 Enzymkinetik.....	108
4.15 Charakterisierung der Tripel-Mutante.....	109
4.15.1 Bestimmung des pH- und Temperaturoptimums sowie der Zeitabhängigkeit.....	109
4.15.2 Enzymkinetik.....	110
4.16 Zusammenfassung der kinetischen Daten.....	112
4.17 Identifizierung der gebildeten Produkte mit Hilfe der LC/MS.....	112
4.18 <i>in situ</i> Hybridisierung (ISH).....	115
4.18.1 ISH von HpBUS- und HpaBPS-Transkripten in <i>H. perforatum</i> Sprosskulturen.....	115
4.19 Detektion von Enzymaktivitäten in Zellkulturen.....	122
<b>5 Diskussion.....</b>	<b>124</b>
5. 1 Klonierung, Charakterisierung, Mutagenese und Lokalisierung der HpBUS.....	124
5.1.1 cDNA-Klonierung und Charakterisierung der HpBUS.....	124
5.1.2 Mutagenese der HpBUS.....	128
5.1.3 Lokalisierung der HpBUS in <i>H. perforatum</i> Sprosskulturen .....	132
5.2 Klonierung von PKS aus <i>Hypericum calycinum</i> .....	135
5.2.1 Klonierung des ORF1 aus <i>H. calycinum</i> –Knospen.....	135
5.2.2 PKS aus <i>Hypericum calycinum</i> -Zellkulturen.....	137
5.3 Enzym-Aktivität in <i>Hypericum perforatum</i> subsp. <i>angustifolium</i> -Zellkulturen.....	139
<b>6 Zusammenfassung.....</b>	<b>140</b>
<b>7 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>142</b>
<b>8 Anhang.....</b>	<b>156</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>6x His</b>	Hexa histidine tag
<b>BAS</b>	Benzalaceton-Synthase
<b>BDS</b>	modifiziertes B5-Medium, nach Dunstan und Short (1977)
<b>BIS</b>	Biphenyl-Synthase
<b>BLAST</b>	Basic Local Alignment Search Tool
<b>BNY</b>	Bisnoryangonin
<b>bp</b>	Basenpaar
<b>BPS</b>	Benzophenon-Synthase
<b>Bq</b>	Becquerel
<b>BUS</b>	Isobutyrophenon-Synthase
<b>BSA</b>	Rinderserumalbumin
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>cDNA</b>	mRNA-komplementäre DNA
<b>CHS</b>	Chalkon-Synthase
<b>CoA</b>	Coenzym A
<b>Da</b>	Dalton
<b>dATP</b>	Desoxyadenosintriphosphat
<b>DAD</b>	Photodioden-Array-Detektor
<b>dCTP</b>	Desoxycytidintriphosphat
<b>ddNTPs</b>	Dye-labeled chain-terminating nucleotides
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	destilliertes Wasser
<b>dp</b>	Degenerierte Primer
<b>DMAPP</b>	Dimethylallylpyrophosphat
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>DNase</b>	Desoxyribonuklease
<b>dNTP</b>	Desoxynukleosidtriphosphat
<b>ddNTP</b>	Didesoxynukleosidtriphosphat
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>EtOH</b>	Ethanol
<b>g</b>	Gramm oder Erdbeschleunigung
<b>Gm</b>	<i>Garcinia mangostana</i>
<b>GPP</b>	Geranyl-Diphosphat
<b>GSP</b>	Genspezifischer Primer
<b>h</b>	Stunde
<b>Ha</b>	<i>Hypericum androsaemum</i>
<b>HCl</b>	Salzsäure
<b><i>H. calycinum</i> / <b>Hc</b></b>	<i>Hypericum calycinum</i>
<b>HEPES</b>	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
<b><i>H. perforatum</i> / <b>Hp</b></b>	<i>Hypericum perforatum</i>

<b>Hpa</b>	<i>Hypericum perforatum</i> subsp. <i>angustifolium</i>
<b>HPLC</b>	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
<b>HSCoA</b>	Freies Coenzym A
<b>Hs</b>	<i>Hypericum sampsonii</i>
<b>IPTG</b>	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid
<b>Kb</b>	Kilobasenpaare
<b>KDa</b>	Kilodalton
<b>K<sub>m</sub></b>	Michaelis Konstante
<b>L</b>	Liter
<b>LB</b>	Lucia-Bertani-Medium
<b>LS</b>	Linsmeier-Skoog-Medium
<b>M</b>	mol/l
<b>MAO</b>	Monoamin-Oxidase
<b>MCS</b>	Multiple cloning site
<b>MeOH</b>	Methanol
<b>min</b>	Minute
<b>ml</b>	Milliliter
<b>mM</b>	millimolar
<b>M-MLV</b>	Moloney-Mäuse-Leukämie-Virus
<b>mRNA</b>	messenger-Ribonukleinsäure
<b>mg</b>	Milligramm
<b>MS</b>	Massenspektrometrie
<b>m/z</b>	Verhältnis Masse zur Ladung
<b>MW</b>	Molekulare Masse
<b>Ni-NTA</b>	Nickel-Nitrilotriessigsäure
<b>µg</b>	Microgramm
<b>µl</b>	Microliter
<b>NaOH</b>	Natronlauge
<b>ng</b>	Nanogramm
<b>NCBI</b>	National Center of Biological Information
<b>nm</b>	Nanometer
<b>OD</b>	Optische Dichte
<b>ORF</b>	open reading frame, offener Leserahmen
<b>PAGE</b>	Polyacrylamidgelelektrophorese
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
<b>Pfu</b>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
<b>PKS</b>	Polyketid-Synthase
<b>pI</b>	Isoelektrischer Punkt
<b>2-PS</b>	2-Pyron-Synthase
<b>RACE</b>	Rapid amplification of cDNA ends
<b>RACElong+short</b>	RACE anchor primer
<b>RNA</b>	Ribonucleic acid
<b>RNase</b>	Ribonuklease
<b>rRNA</b>	Ribosomale RNA
<b>rpm</b>	Umdrehungen pro Minute

<b>RT</b>	Raumtemperatur / Reverse Transkriptase
<b>SDS</b>	Sodium dodecyl sulphate
<b>sec.</b>	Sekunde
<b>SMART-RACE</b>	Switching Mechanism At 5' end of RNA Template-RACE
<b>STS</b>	Stilben-Synthase
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>TAE</b>	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<b>TAL</b>	Triacetic acid lactone, Triacetat-Lakton, 6-Methyl-4-hydroxy-2-pyron
<b>TD-Primer</b>	TATA-Box Degenerierte Primer
<b>Taq</b>	<i>Thermus aquaticus</i>
<b>TE</b>	Tris-EDTA
<b>TEMED</b>	<i>N, N, N',N'</i> - Tetramethylethylendiamin
<b>TdT</b>	Terminale Transferase
<b>Tris</b>	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
<b>tRNA</b>	total RNA
<b>U</b>	Unit (Aktivitätseinheit von Enzymen) oder Umdrehungen
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>VIS</b>	Sichtbares Licht
<b>VPS</b>	Valerophenon-Synthase
<b>v/v</b>	Volumen pro Volumeneinheit
<b>V</b>	Volumen, Volt
<b>w/v</b>	Gewicht pro Volumeneinheit
<b>W</b>	Watt
<b>X-Gal</b>	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-b-D-galaktosid
<b>x g</b>	-fache Erdbeschleunigung

#### Aminosäuren

<b>Alanin</b>	Ala	A	<b>Leucin</b>	Leu	L
<b>Asparagin</b>	Asn	N	<b>Lysin</b>	Lys	K
<b>Asparaginsäure</b>	Asp	D	<b>Methionin</b>	Met	M
<b>Arginin</b>	Arg	R	<b>Phenylalanin</b>	Phe	F
<b>Cystein</b>	Cys	C	<b>Prolin</b>	Pro	P
<b>Glutamin</b>	Gln	Q	<b>Serin</b>	Ser	S
<b>Glutaminsäure</b>	Glu	E	<b>Threonin</b>	Thr	T
<b>Glycin</b>	Gly	G	<b>Tryptophan</b>	Trp	W
<b>Histidin</b>	His	H	<b>Tyrosin</b>	Tyr	Y
<b>Isoleucin</b>	Ile	I	<b>Valin</b>	Val	V

#### Nukleinsäuren

<b>Adenin</b>	A
<b>Cytosin</b>	C
<b>Guanin</b>	G
<b>Thymin</b>	T
<b>Uracil</b>	U

**Nomenklatur für Wobble-Basen zur Konstruktion degenerierter PCR-Primer**

<b>Buchstaben-Code</b>	<b>Basen</b>
<b>B</b>	C oder G oder T
<b>D</b>	A oder G oder T
<b>H</b>	A oder C oder T
<b>K</b>	G oder T
<b>M</b>	A oder C
<b>N</b>	A oder C oder G oder T
<b>R</b>	A oder G
<b>S</b>	C oder G
<b>V</b>	A oder C oder G
<b>W</b>	A oder T
<b>Y</b>	C oder T

## 1 Einleitung

### 1.1 Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.)

#### 1.1.1 Name und Geschichte



Das Johanniskraut, *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae; Abb. 1.1, 1.2) ist eine Arzneipflanze, deren Nutzung sich bis in die Antike zurückverfolgen läßt. Die Herkunft des botanischen Namens leitet sich nach Czygan (1993) aus dem griechischen hyper (über) und eikon (Bild) ab. Pflanzen der Gattung *Hypericum* sollen zur Abwendung böser Geister über Götterfiguren oder Bildern befestigt worden sein. In einem Kräuterbuch des sechzehnten Jahrhunderts (Fuchs, 1543) wird Johanniskraut auch Fuga daemonum genannt. In verschiedenen Kulturen diente *Hypericum* zur

**Abb. 1.1:** Historische Darstellung      Abschreckung von Geistern.

In einem weiteren Ansatz interpretieren Hölz et al. (1994) den Gattungsnamen als hyper (über) und ereikon (Heide), als über der oder größer als die Heide wachsend. Die Artbezeichnung *perforatum* weist auf die durchscheinend punktierten Blätter hin (Abb. 1.3). Es handelt sich hierbei um Ölbehälter schizogenen Ursprungs.

Eine erste Erwähnung findet die Gattung *Hypericum* nach Czygan (1993) bereits in der Antike bei Plinius dem Älteren (23-79 n. Chr.) sowie bei Pedanios Dioskurides von Anazarbos (77 n. Chr) in seinem Werk *ὑπερικόν ἑρμαίου* (in der lat. Übersetzung: *de materia medica libri quinque*), das nach Tschierch (1933) für mehr als eineinhalb Jahrtausende "...das Orakel der Heilmittellehre, die Bibel der Pharmakologen und die oberste Instanz für die Kenntnis der Arzneipflanzen..." darstellte. Dioskurides unterscheidet zwischen vier Johanniskrautarten, wobei der Begriff *hypericón* nach Hegi (1970) auf das in Griechenland weit verbreitete *H. crispum* (oder *H. barbatum*) zurückgeht. Weiter wurden *H. perforatum*, *H. ciliatum* sowie *H. coris* zugeordnet. Die Bezeichnung *H. perforatum* ist bereits im Mittelalter gebräuchlich und

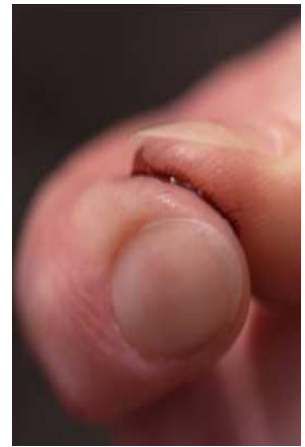
wurde von dem Systematiker Carl von Linné 1753 in *Species plantarum* übernommen (Czygan, 1993).

### 1.1.2 Botanik

Die Gattung *Hypericum* war in ganz Europa, auf den Kanaren und Nordafrika verbreitet und umfasst mehr als 450 Arten. Von diesen Gebieten wurde es nach Nord- und Südamerika, dort vor allem nach Chile (Hegi, 1970) und Kanada eingeschleppt (Hildebrand et al., 1991).

Johanniskraut wächst häufig an sonnigen und trockenen Standorten wie Böschungen, Weg- und Straßenrändern, Bahndämmen sowie Trocken- und Halbtrockenwiesen. Die Staude erreicht eine Höhe von 20 bis 100 cm und blüht von Juni bis August.

Die Blüten sind in einer Trugdolde angeordnet und mit kahlen, schwarzdrüsigen Stielen versehen (Abb. 1.2, 1.4). Die Kelchblätter sind etwa 6 mm lang und fein zugespitzt, gesägt oder ganzrandig. Die Kronblätter sind schief-elliptisch und bei einer Länge von 10-13 mm einseitig gekerbt, von goldgelber Farbe mit schwarzen Punkten oder Strichen.



**Abb. 1.2:** Johanniskraut   **Abb. 1.3:** *H. p* Blätter   **Abb. 1.4:** *H. p* Blüte   **Abb. 1.5:** roten Saft

Die Bezeichnungen Johanniskraut, Johannisblut und Sonnenwendkraut verweisen auf die Zeit des Blühbeginns der Pflanze im Juni. Beim Trocknen von Gras führt vorhandenes Johanniskraut wegen seiner derben Stengel zu einem harten Heu, was ihm den deutschen Namen Tüpfel-Hartheu einbrachte. Der beim Zerreiben der Blüten austretende blutrote Saft (Abb. 1.5) und die eigenartig perforiert erscheinenden Blätter nährten den Aberglauben und führten zu den Bezeichnungen Hexenkraut, Teufelsflucht und Jageteufel (Rauh et al., 1976; Rothmaler, 1970; Wichtl 1983).



## 1.2 Inhaltsstoffe

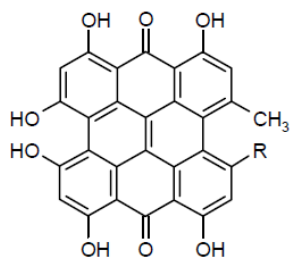
Johanniskraut enthält ein breites Spektrum an sekundären Pflanzenstoffen (Beerhues, 2010; Asgarpanah, 2012). Wie weit diese an der pharmakologischen Wirkung beteiligt sind, wird noch diskutiert. Sie lassen sich in folgende Gruppen unterteilen.

### 1.2.1 Naphthodianthrone

Die Naphthodianthrone bzw. Hypericine (Abb. 1.6) bilden eine für die Gattung *Hypericum* charakteristische Inhaltsstoffgruppe. Diese sehr lipophilen Anthronderivate stellen die blutroten Pigmente dar, welche in den Blüten und Blättern vorkommen. Insgesamt werden ca. 0,1 % Hypericin und Pseudohypericin im getrockneten Kraut gefunden (Nahrstedt und Butterweck, 1997; Hölz und Petersen, 2003). Ihr Gehalt ist in Blüten und Knospen mit 0,2 bis 0,3 % der Trockenmasse am höchsten.

Aufgrund verschiedener pharmakodynamischer Effekte stellen die Hypericine eine interessante Inhaltsstoffgruppe dar. Suzuki et al. (1984) stellten *in vitro* eine irreversible Hemmung der beiden Isoenzyme Monoaminoxidase A (MAO-A) und B (MAO-B) durch Hypericin fest, was auch für einige synthetische Antidepressiva gilt. Dieses Ergebnis konnte allerdings in *ex vivo*-Experimenten nicht bestätigt werden und auch Molecular Modeling-Experimente sprechen eher gegen eine Hemmung der MAO-A (Höltje und Walper, 1993). In weiteren *in vitro* Systemen konnte mit Hypericin eine Hemmung der 12-Lipoxygenase (Bezáková et al., 1999) und der Dopamin  $\beta$ -Hydroxylase (Denke et al., 2000) gezeigt werden.

Hypericin kann selektiv in Tumorzellen aufgenommen werden und dort unter UV-Licht Apoptose induzieren, weswegen es eine vielversprechende Verbindung für die photodynamische Therapie ist (Agostinis et al., 2002; Kubin et al., 2005; Olivo et al., 2006). Es besitzt zudem eine antivirale Wirkung, indem es die Replikation verkapselter Viren inhibiert (Meruelo et al., 1989). Neben Hypericin kommt in geringer Menge das Naphthodianthron Pseudohypericin (Abb. 1.6) im Johanniskraut vor, welches eine schwächere Wirkung auf Viren zeigt (Vandenbogaerde et al., 1998).



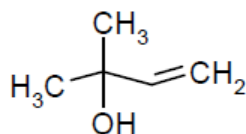
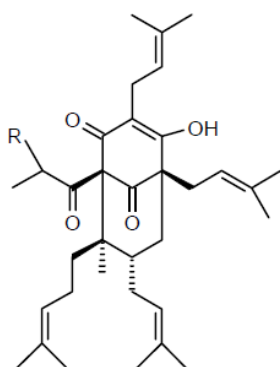
R = CH<sub>3</sub>      Hypericin  
 R = CH<sub>2</sub>OH    Pseudohypericin

**Abb. 1.6:** Naphthodianthrone aus *Hypericum perforatum* L.

### 1.2.2 Hyperforin

Ein weiterer charakteristischer Inhaltsstoff des Johanniskrauts ist das Phloroglucinderivat Hyperforin (Abb. 1.7), welches mit ca. 4,5 % im getrockneten Kraut gefunden wird (Bystrov et al. 1975; Maisenbacher et al. 1992). Hyperforin erreicht die höchste Konzentration in den reifen Früchten mit ca. 8,5 % (Tekelová et al., 2000).

Neben Hyperforin wurde in Blüten und Früchten ein zweites Acylphloroglucin, das Adhyperforin (Abb. 1.7) detektiert (Maisenbacher und Kovar, 1992). Blüten enthalten durchschnittlich 0,2 % und Früchte bis zu 2 % Adhyperforin.



R = H      Hyperforin  
 R = CH<sub>3</sub>    Adhyperforin      2-Methyl-3-buten-2-ol

**Abb. 1.7:** Phloroglucine und ein Abbauprodukt aus *Hypericum perforatum*

Hyperforin ist entscheidend an der antidepressiven Wirkung von Johanniskraut beteiligt (Perovic, 1995; Cervo et al., 2002). In biochemischen *in vitro*-Testsystemen und im Tiermodell wurde für Hyperforin eine Hemmung der neuronalen Wiederaufnahme nachgewiesen, woraus eine Erhöhung der Konzentration von Überträgerstoffen im synaptischen Spalt resultiert. Hyperforin verhindert die Wiederaufnahme von Serotonin, Dopamin, Noradrenalin, L-Glutamat, Aspartat und  $\gamma$ -Aminobuttersäure (Chatterjee et al., 2001) und reguliert die kortikalen  $\beta$ - und 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptoren herunter (Müller et al., 1998). Kürzlich wurde die Zielstruktur des Hyperforins, TRPC6, identifiziert (Leuner et al., 2012).

Hyperforin wird in jüngerer Zeit auch mit Nebenwirkungen des Johanniskrautextraktes in Zusammenhang gebracht: als Ligand für den Pregnan X-Rezeptor induziert es eine vermehrte Expression der Cytochrom P450 3A4 Monooxygenase (CYP3A4), die als Phase-I-Enzym vermehrt andere Xenobiotika in der Leber metabolisiert, mit der Folge, dass deren Plasmaspiegel sinken (z. B. Cyclosporin, orale Kontrazeptiva) (Moore et al., 2000; Madabushi et al., 2006). Hyperforin weist zudem einen anti-inflammatorischen Effekt auf (Albert et al., 2002; Hammer et al., 2007; Crockett et al., 2008).

Als lipophiles Phloroglucinol zeigt Hyperforin eine ausgeprägte Wirksamkeit gegen multiresistente *Staphylococcus aureus*-Stämme und Gram-positive Bakterien (Schempp et al., 1999; Reichling et al., 2001; Saddige et al., 2010). Desweiteren ist Hyperforin ein Hemmer der Zyklooxygenase 1 (COX-1) und der 5-Lipoxygenase, wodurch die Bildung von Entzündungsmediatoren eingeschränkt wird (Albert et al., 2002; Feißt et al., 2009). Diese Eigenschaften erklären auch die traditionelle Verwendung bei Brandwunden und Verletzungen. Außerdem zeigt die Verwendung bei entzündlichen Hautkrankheiten wie dem atopischen Ekzem großen Erfolg (Schempp et al., 2003).

Das Abbauprodukt Methylbutenol (Abb. 1.7) hat zwar *in vivo* sedative Eigenschaften, allerdings ist die Konzentration im Extrakt zu gering, um eine relevante Wirkung zu erzielen (Nahrstedt und Butterweck, 1997).

### 1.2.3 Flavonoide

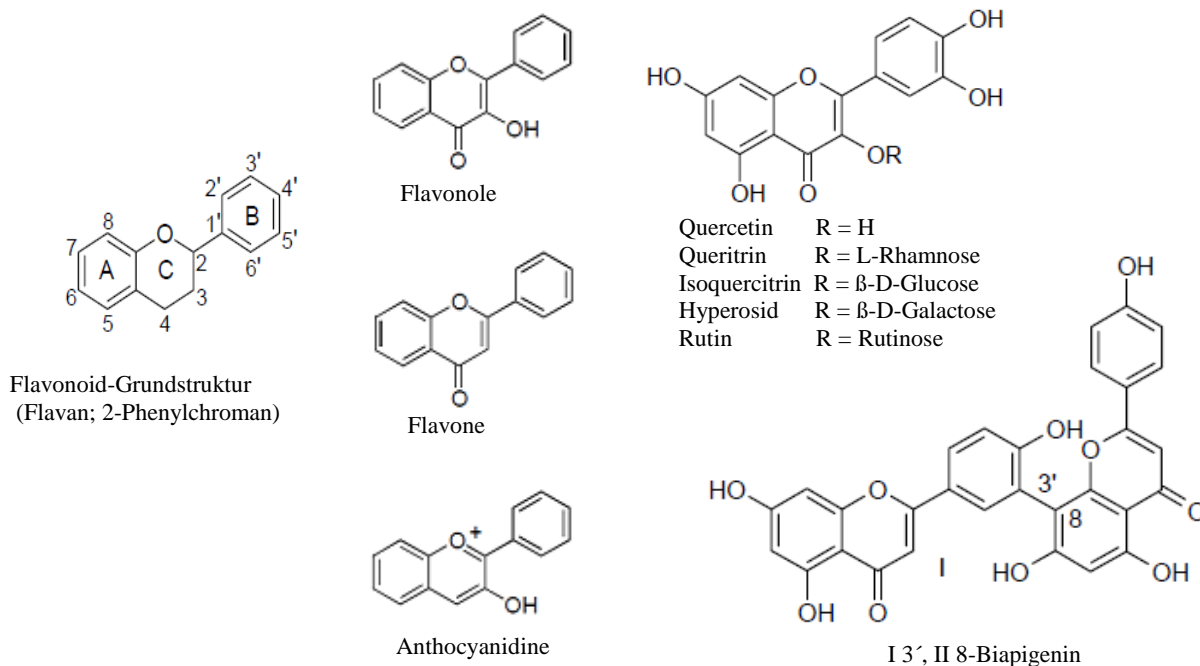
Über 5000 verschiedene natürliche Flavonoide sind derzeit bekannt (Harborne und Williams, 2000). Sie sind Polyphenole und lassen sich aufgrund von Strukturmerkmalen in Gruppen

einteilen. Diese sind beispielsweise Flavonole, Flavone, Flavanone, Catechine, Isoflavone, Dihydroflavonole, Anthocyanidine und Chalkone.

Johanniskraut enthält ein breites Spektrum an Flavonoiden (2 bis 4 %), von denen die Quercetinglykoside Hyperosid (0,7 %), Rutosid (Rutin) (0,3 %), Quercitrin (0,3 %) und Isoquercitrin (0,3 %) die Hauptkomponenten sind (Nahrstedt und Butterweck, 1997). Als Aglyka kommen Quercetin, Dihydroquercetin, Kämpferol, Luteolin und Myricetin vor. Charakteristisch für diese Art ist das Vorkommen der sonst in der Natur eher selten anzutreffenden Biflavonoide I3,II8-Biapiogenin (0,1 bis 0,5 %) und I3',II8-Biapiogenin (Amentoflavon) in geringen Mengen (0,01 - 0,05 %) (Abb. 1.8). Diese sind nur in den Blüten von *Hypericum perforatum* L. lokalisiert (Berghöfer und Hölzl, 1987). Aufgrund zahlreicher pharmakologischer Wirkungen kommt den Flavonoiden bis heute in der öffentlichen Wahrnehmung eine große Bedeutung zu.

Sie sollen unter anderem antioxidative, antiinflammatorische sowie antimutagene Eigenschaften besitzen (Middleton et al., 2000; Scalbert et al., 2005; Naeem et al., 2010).

Immunmodulatorische und neuroprotektive Effekte von Flavonoiden haben erst in den letzten Jahren eine zunehmende wissenschaftliche Beachtung erfahren. Sie stehen miteinander in enger funktioneller Verbindung. Für beide Wirkungskreise werden antioxidative Mechanismen bzw. Einflussnahmen auf die Signaltransduktion und auf Schlüsselenzyme des Zellstoffwechsels diskutiert (Youdim, 2002).



**Abb. 1.8:** Flavonoide aus *Hypericum perforatum* L.

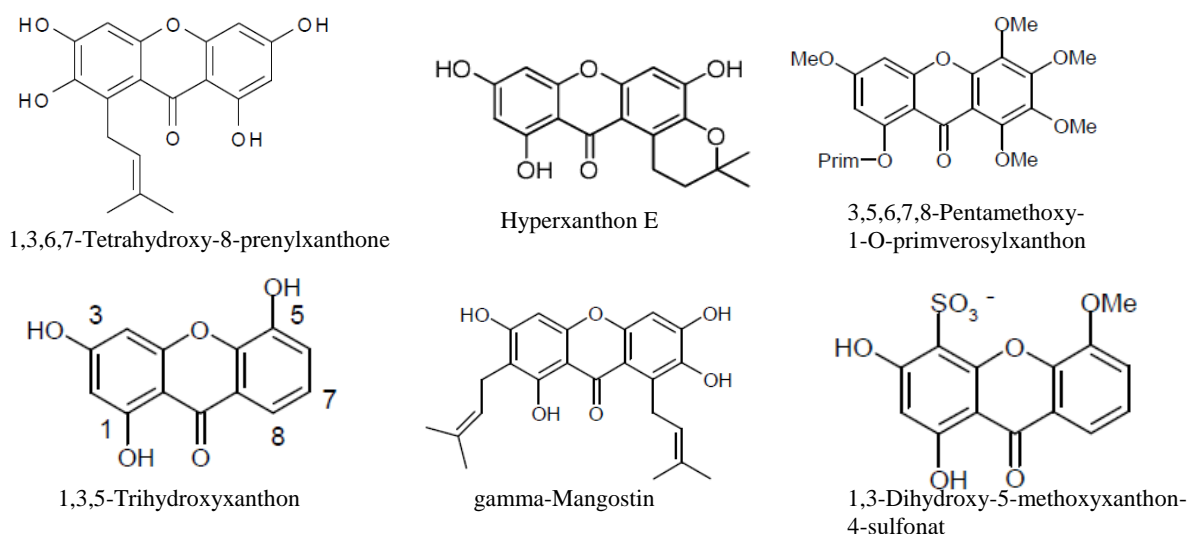
#### 1.2.4 Xanthone

Xanthone (Abb. 1.9) stellen eine Inhaltsstoffgruppe dar, welche für die Hypericaceae und Gentianaceae typisch ist (Frohne, 1998; Bennet, 1989). Ihre Vorstufe sind Benzophenone (Beerhues, 2009). So konnten in Zellkulturen von *Centaurium erythraea* polymethoxylierte Xanthone und in Zellkulturen von *Hypericum androsaemum* und *H. perforatum* prenylierte Xanthone nachgewiesen werden (Beerhues und Berger, 1995; Schmidt et al., 2000; Abd El-Mawla et al., 2001; Franklin et al., 2009). In Zellkulturen von *Hypericum calycinum* wurden prenylierte und nicht prenylierte Xanthone (Hyperxanthon E) nachgewiesen (Zodi, 2010; Gaid et al., 2012) (Abb. 1.8). Xanthone können in Pflanzen sowohl als Glykoside wie auch als Ester der Sulfonsäure vorliegen (Hong et al., 2004).

Sie besitzen unterschiedlichste pharmakologisch bedeutende Eigenschaften. So konnten antimikrobielle (Nkengfack et al., 2002; Franklin et al., 2009; Tocci et al., 2011), antimutagene (Schimmer und Mauthner, 1996), antiretrovirale (Groweiss et al., 2000) sowie zytotoxische und antitumorale Wirkungen (Abou Shoer et al., 1988) gezeigt werden. Xanthone sind potente Inhibitoren der Monoaminoxidase A und B (Suzuki et al., 1981). Obgleich dieser Effekt bei der Behandlung von Depressionen relevant ist, tragen die Xanthone wohl nicht zur Wirkung der als

Antidepressivum eingesetzten Heilpflanze *H. perforatum* bei. Verwendung findet hier nämlich das Kraut der Pflanze, die Xanthone sind jedoch hauptsächlich in der Wurzel lokalisiert (Greeson et al., 2001; Tocci et al., 2011).

Daneben konnten antimykotische Wirkungen für Xanthone gefunden werden (Morel et al., 2002). Ebenso geht von 1,3,7-trioxydierten und in Position 2 und 8 prenylierten Xanthonen eine Aktivität gegen den Malariaerreger *Plasmodium falciparum* aus (Hay et al., 2004). Darüber hinaus wurden auch vasorelaxierende Effekte für Xanthone beschrieben (Chericoni et al., 2003).  $\gamma$ -Mangostin, ein Xanthon aus *Garcinia mangostana*, hemmt die Cyclooxygenasen 1 und 2, wodurch es zu einer verringerten Freisetzung von Prostaglandin E<sub>2</sub> in C6-Gliomazellen von Ratten kommt (Nakatani et al., 2002).



**Abb. 1.9:** Xanthon-Derivate

### 1.2.5 Weitere Inhaltsstoffe

Im getrockneten Kraut von *Hypericum perforatum* L. finden sich zwischen 5 und 15 % Gerbstoffe, die dem Catechin-Typ zugeordnet werden können. Auf Grund dieses hohen Gehaltes wird Johanniskraut gelegentlich auch als Gerbstoffdroge bezeichnet. Neben Catechingerbstoffen treten Procyanidine auf (Hölzl et al. 1994). In alkoholischen Extrakten ist der Gerbstoffgehalt allerdings gering.

Das ätherische Öl (0,05-0,3%) von *H. perforatum* ist in schizogenen Ölbehältern des Mesophylls lokalisiert und besteht hauptsächlich aus höheren n-Kohlenwasserstoffen. Daneben treten auch Mono- und Sesquiterpene mit  $\alpha$ -Pinen und Caryophyllen als Hauptvertretern auf (Guedes et al., 2004; Bertoli et al., 2011; Alireza, 2012).

### 1.3 Johanniskraut bei der Behandlung von Depression

Das Tüpfel-Johanniskraut (*H. perforatum* L.) spielt eine zentrale Rolle in der Phytotherapie von leichten bis mittelschweren Depressionen und psychovegetativen Störungen.

#### 1.3.1 Depression

Depressionen gehören neben den Angststörungen zu den häufigsten psychischen Erkrankungen im Erwachsenenalter (Berger und van Calker, 2004). Etwa 20 % der Menschen leiden in ihrem Leben mindestens einmal unter einer depressiven Störung (Wittchen et al., 1995). Verschiedenen Punktprävalenzstudien zufolge sind in Deutschland 2-3 % der Männer und 4-7 % der Frauen erkrankt (Hautzinger, 1996).

Die 12-Monats-Prävalenz depressiver Störungen Erwachsener in Deutschland beträgt nach den Ergebnissen des Bundesgesundheits-Surveys 10,7 % (Jacobi et al., 2004). Das bedeutet, dass in Deutschland mindestens vier Millionen Bundesbürger pro Jahr von einer depressiven Episode betroffen sind. Frauen sind mit 14 % häufiger betroffen als Männer mit 7,5 % (Jacobi et al., 2004).

Depressive Störungen gelten schon lange als stressassoziierte Störungen, die vor dem Hintergrund einer Vulnerabilität, bedingt unter anderem durch genetische Faktoren und frühkindliche Lernerfahrungen, beim Erleben von Stress (z.B. kritischen Lebensereignissen) ausbrechen. Die Erforschung der biologischen Korrelate und Ursachen dieser stressbezogenen Störung hat in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht. Metaanalysen belegen beispielsweise die Assoziation des Serotonin-Transporter-Polymorphismus (5-HTTLPR) mit depressiven Störungen und der mit Depression assoziierten Persönlichkeitseigenschaft Neurotizismus (Sen et al., 2004; Clarke et al., 2010; Kiyohara und Yoshimasu, 2010). Das Konzept der Endophänotypisierung, welches zunehmend an Bedeutung gewinnt, nimmt an, dass psychische Störungen „neurobiologisch bedingt bzw. verursacht“ sind (Zobel und Maier, 2004). Eine Dysfunktion der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-

Achse) und eine reduzierte Serotoninfunktion an den Thrombozyten werden als erfolgversprechende Endophänotypen angesehen. Ebenfalls ist der Hippocampus, welcher der neurotoxischen Wirkung der Glukokortikoide unterliegt, eine wichtige Hirnstruktur im Zusammenhang mit depressiven Störungen (McKinnon et al., 2009).

### 1.3.2 Johanniskrautextrakt

Johanniskrautextrakte werden aus dem getrockneten Kraut von *H. perforatum* hergestellt. Johanniskrautextrakt wird heutzutage häufig in der Therapie von leichter bis mittelstarker Depression eingesetzt (Melzer et al., 2010; Rapaport et al., 2011). Außerdem wird es häufig in der Selbstmedikation bei psychovegetativen Störungen, nervöser Unruhe und Angst angewendet (Abb. 1.10).



**Abb. 1.10:** Beispiele von Johanniskrautextrakt-Medikamenten

Es stellt eine sinnvolle und akzeptierte Alternative zu den mit größeren Nebenwirkungen behafteten synthetischen Antidepressiva dar, denn Johanniskrautextrakt weist wesentlich weniger unerwünschte Arzneimittelwirkungen auf. Bei Johanniskrautextrakt handelt es sich um ein Vielstoffgemisch. Im Extrakt sind u.a. enthalten: Phloroglucinolderivate wie Hyperforin und Adhyperforin, die Naphtodianthrone Hypericin und Pseudohypericin und Flavonoide wie Hyperosid, Quercetin, Biapigenin und Rutin (Reichling et al., 2003). Des Weiteren berichten zahlreiche Autoren, dass Hyperforin, Adhyperforin, Hypericin und Kämpferol die synaptosomale Wiederaufnahme der fünf Neurotransmitter Serotonin, Dopamin, Noradrenalin,  $\gamma$ -Aminobuttersäure und L-Glutamat hemmen (Perovic und Müller, 1995; Müller et al., 1997 und 1998; Singer et al., 1999; Jensen et al., 2001). Hyperforin und Adhyperforin zeigen hierbei die stärkste Aktivität (Wonnemann et al., 2001).

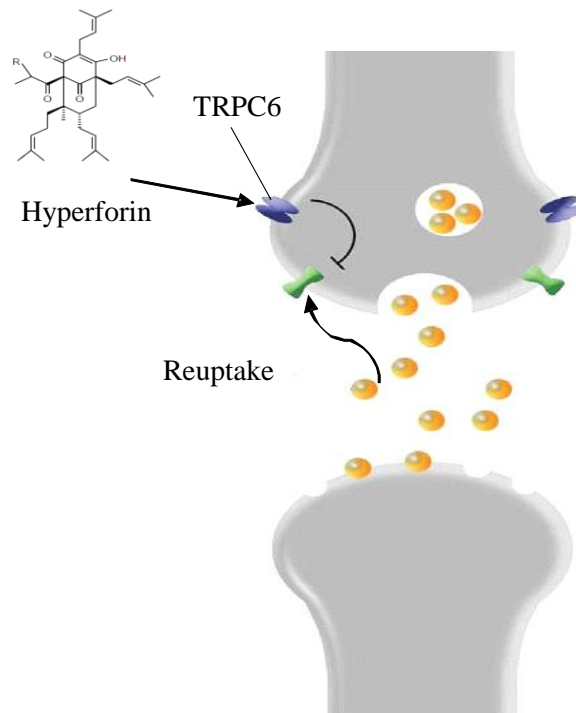


Hyperforin hemmt die synaptosomale Wiederaufnahme von Serotonin, Dopamin, Noradrenalin, Glutamat und Gamma-Aminobuttersäure (GABA) (Chatterjee et al., 2001; Ullah Khan et al., 2011; Devrim Can und Özkay, 2012). Diese Breitbandwirkung hängt mit dem besonderen Wirkmechanismus zusammen. Durch Aktivierung nichtselektiver Kationenkanäle erhöht Hyperforin die intrazelluläre Natriumionenkonzentration und hemmt so den natriumgetriebenen Symport der Neurotransmitter ins Axon (Müller, 2003; Treiber et al., 2005). Es unterscheidet sich damit von synthetischen Antidepressiva, die meist direkt an den Neurotransmitter-Rezeptoren angreifen und die Transporter damit kompetitiv inhibieren, wie z.B. selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRI). An diese Erhöhung der Neurotransmitter im synaptischen Spalt schließen sich Veränderungen der Rezeptorendichte und -sensibilität der nachgeschalteten Zelle an. Vor kurzem wurde die These aufgestellt, dass Hyperforin über Imitation der Funktion des "Brain-Derived Neurotrophic Factor" (BDNF) wirken könnte, welcher morphologische Änderungen der dendritischen Dornen verursacht. Bei depressiven Patienten ist die Menge an BDNF im Hippocampus verringert, dessen Wiederanstieg man während der Therapie mit Antidepressiva beobachten konnte. Es wird angenommen, dass die unter Antidepressiva erhöhte Neurotransmitterkonzentration im synaptischen Spalt zu einer vermehrten Rezeptorenaktivierung führt, die u.a. die vermehrte Transkription des BDNF-Gens induziert. Vermutlich sind die von BDNF induzierten Änderungen der finale Wirkmechanismus von Antidepressiva. BDNF agiert durch eine Aktivierung von TRPC3-Kanälen, wobei es zu einem Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  in die Synapse kommt. Auch nach Aktivierung von TRPC6 durch Hyperforin kommt es zu einem Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  und somit zu den erwähnten morphologischen Änderungen (Leuner et al., 2012) (Abb. 1.11).

In vielen randomisierten placebokontrollierten Doppelblindstudien wurde nachgewiesen, dass auf Hyperforin standardisierter Johanniskrautextrakt bei leichten bis mittelschweren Depressionen den synthetischen Antidepressiva ebenbürtig oder sogar überlegen ist (Kalb et al., 2001; Gastpar et al., 2006; Brattström, 2009). Denn das Nebenwirkungsspektrum ist gering und bei hochdosierten Präparaten ist eine Tablette am Tag ausreichend. Das führt zu einer deutlich

erhöhten Compliance. Auch der Einsatz bei schweren Depressionen scheint mittlerweile gerechtfertigt (Kasper et al., 2006; Rahimi et al., 2009).

Trotz seiner Instabilität ist Hyperforin gut bioverfügbar und nach 2-6 Stunden wird der maximale Plasmaspiegel erreicht. Die Halbwertszeit bei Menschen beträgt 15 Stunden (Biber et al., 1998). Es wird eine Tagesdosis von 300-900 mg Gesamtextrakt empfohlen, wobei ähnlich zu synthetischen Antidepressiva mit einer Latenzzeit von 2-3 Wochen zu rechnen ist.



**Abb. 1.11:** Wiederaufnahmehemmung („reuptake inhibition“) von Neurotransmittern durch Hyperforin (aus Müller, 2013)

## 1.4 *Hypericum calycinum*

*Hypericum calycinum* L. (Abb. 1.12) ist eine andere Pflanzenart aus der Gattung der Johanniskräuter (*Hypericum*) in der Familie der Johanniskrautgewächse (Hypericaceae).



**Abb. 1.12:** *Hypericum calycinum* L.

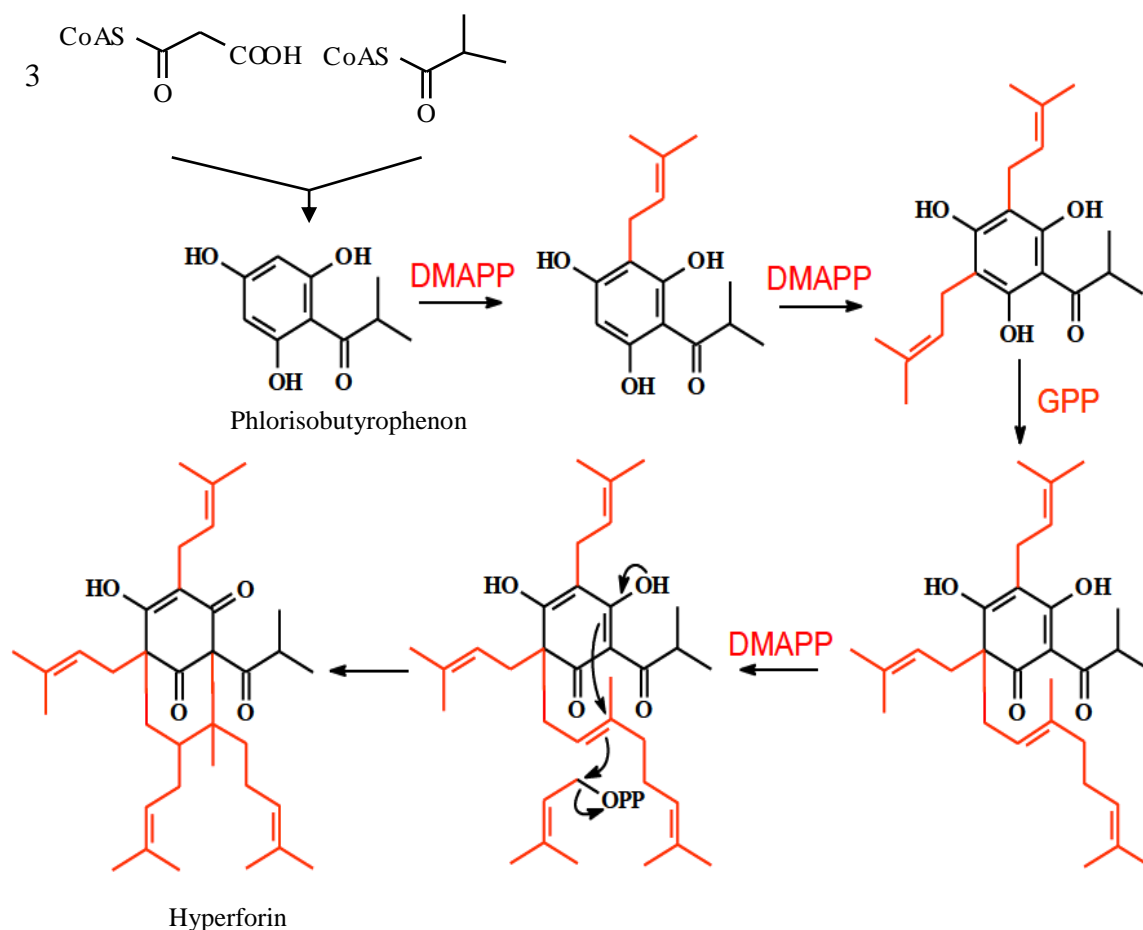
Prenylierte Phloroglucin-Derivate wurden aus *H. calycinum* isoliert und zeigen in *in vitro*-Tests antimykotische, antiplasmodiale und zytotoxische Aktivität (Decosterd et al., 1989; Decosterd et al., 1991).

Alkoholische Extrakte aus intakten Pflanzen von *H. calycinum* hatten im Test mit Mäusen eine ähnliche Wirkung auf das zentrale Nervensystem wie die aus *H. perforatum* gewonnenen Extrakte (Öztürk, 1997).

Zellkulturen von verschiedenen *Hypericum*-Arten wurden auf Hyperforin-Bildung untersucht (Zapletalová, 1999). Dabei zeigte sich, dass nur Kulturen von *H. calycinum* Hyperforine, vor allem das Adhyperforin, enthalten. Sie stellen daher, neben intakten Pflanzen von *H. perforatum*, ein gutes *in vitro*-System für die Untersuchung der Biosynthese von Hyperforinen dar. Zudem gab es biochemische Hinweise, dass das Grundgerüst der Hyperforine von einer Typ III-Polyketid-Synthase gebildet wird (Zapletalová, 1999).

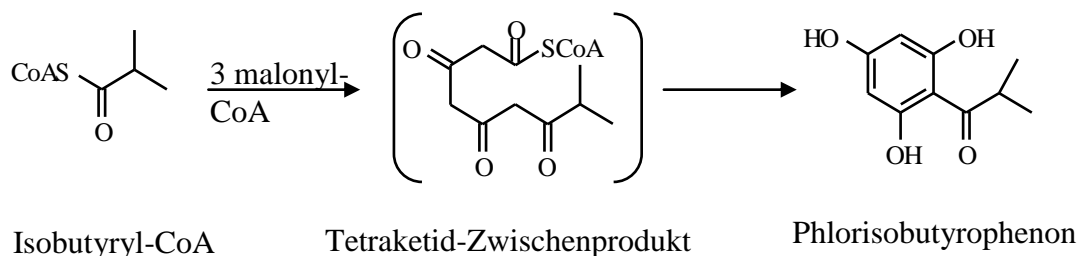
## 1.5 Biosynthese des Hyperforins

Die Biosynthese des Hyperforins kann in zwei Abschnitte gegliedert werden: erstens die Bildung des Grundgerüsts und nachfolgend die Prenylierungsreaktionen. Der vorgeschlagene Biosyntheseweg ist in Abb. 1.13 dargestellt.



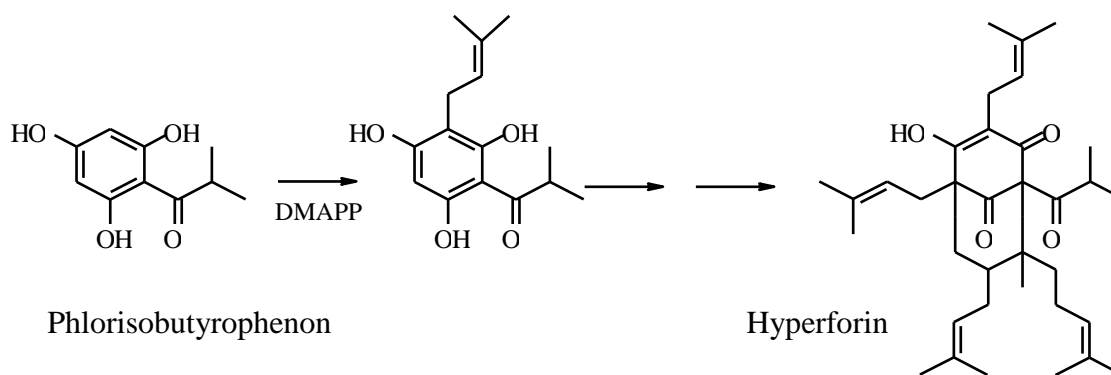
**Abb. 1.13:** Vorgeschlagener Hyperforin-Biosyntheseweg (Adam et al., 2002; Beerhues, 2006)

Die Bildung des Hyperforin-Grundgerüsts wird von einer Typ III-Polyketid-Synthase, der Isobutyrophenon-Synthase (BUS), katalysiert (Klingauf et al., 2005). Bei der Reaktion werden drei Moleküle Malonyl-CoA mit einem Molekül Isobutyryl-CoA, das aus L-Valin gebildet wird, kondensiert (Adam et al., 2002; Karppinen et al., 2007). Das lineare Intermediat wird in demselben aktiven Zentrum durch intramolekulare Claisen-Kondensation zum Phlorisobutyrophenon zyklisiert (Abb. 1.14). Diese Reaktion wurde in Zellkulturen von *H. calycinum* nachgewiesen. Im Falle des Adhyperforins wird 2-Methylbutyryl-CoA als Starter-Einheit verwendet.



**Abb. 1.14:** Reaktion der Isobutyrophenon-Synthase (BUS)

Das Hyperforin-Skelett wird unter Katalyse von Prenyltransferasen mehrfach prenyliert. Die letzte C-Alkylierung geht mit einer Zyklisierung zum bizyklischen Hyperforin einher. Als Prenyldonor der ersten Prenylierung fungiert Dimethylallylpyrophosphat. Dieser erste Prenylierungsschritt wurde ebenfalls in Zellkulturen von *H. calycinum* nachgewiesen (Boubakir et al., 2005) (Abb. 1.15). Er wird von einer löslichen und  $\text{Fe}^{2+}$ -abhängigen Prenyltransferase katalysiert.



**Abb. 1.15:** Der erste Prenylierungsschritt in der Hyperforin-Biosynthese mit DMAPP als Prenyldonor (Boubakir et al., 2005)

## 1.6 Sekundäre Pflanzenstoffe

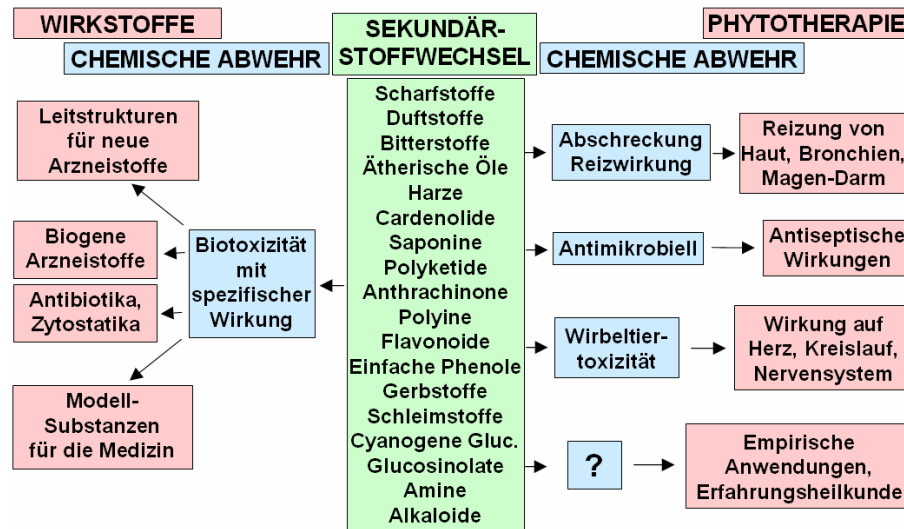
Die Wirkstoffe des Johanniskrauts sind Produkte des Sekundärstoffwechsels. Grundsätzlich werden primäre von sekundären Pflanzenstoffen unterschieden. Bei den primären Pflanzenstoffen handelt es sich um Verbindungen, die für das Wachstum und die

Differenzierung von Pflanzen notwendig sind und vom menschlichen Körper als Nahrungsstoffe verwertbar sind, v. a. Kohlenhydrate, Fette und Eiweiße.

Mehr als 200.000 Strukturen von sekundären Pflanzenstoffen sind bereits bekannt (Hartmann und Ober, 2003). Diese stammen aus chemisch sehr unterschiedlichen Stoffklassen, wie zum Beispiel Phenylpropanen, Terpenen, Alkaloiden, Polyketiden und Glucosinolaten. Häufig treten diese Pflanzeninhaltsstoffe nur in bestimmten Pflanzentaxa auf und sind dadurch von chemotaxonomischer Bedeutung. Trotz der Diversität der sekundären Pflanzenstoffe leiten sich diese von wenigen Biosynthesewegen des Primärstoffwechsels ab (z.B. dem Shikimat-Weg). Die Vielzahl von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen entsteht durch Modifikationen auf zwei Ebenen. Zunächst werden Produkte des Primärstoffwechsels in Sekundärstoffe überführt. Auf einer zweiten Ebene werden diese Stoffe glycosyliert, acyliert, prenyliert oder methyliert.

Die Funktion von sekundären Pflanzenstoffen für die Pflanze war lange Zeit ungeklärt. Zunächst wurde vermutet, dass diese „Nebenprodukte“ des pflanzenlichen Organismus dazu dienen, unnütze oder toxische Stoffwechselprodukte des primären Stoffwechsels zu eliminieren. Heute gilt die Erkenntnis, dass sekundäre Pflanzenstoffe wichtige ökologische Aufgaben in der Interaktion mit der Umwelt erfüllen. Sie werden u.a. als Abwehrstoffe gegen Schädlinge und Krankheiten, als Wachstumsregulatoren und als Farb- und Lockstoffe von der Pflanze synthetisiert (Bitsch, 1999).

Dadurch haben sekundäre Pflanzenstoffe auch eine herausragende Schutzfunktion für den menschlichen Körper. Sie können zur Vorbeugung verschiedenster Erkrankungen und Beschwerden eingesetzt werden und die Gesundheit unterstützen (Hartmann und Ober, 2003) (Abb. 1.16). Sie sind z.B. echte Geheimwaffen im Kampf gegen schädliche freie Radikale und darum bedeutend für den effektiven Schutz von Zellen und Zellbausteinen.



**Abb. 1.16:** Biologische Notwendigkeit und medizinischer Nutzen des Sekundärstoffwechsels (Hartmann und Ober, 2003)

## 1.7 Polyketidsynthesen

Viele Sekundärstoffe werden durch Polyketidsynthesen (PKS) gebildet. Diese zählen zu den Acyltransferasen und zeichnen sich durch den Transfer von in der Regel Acetyleinheiten auf unterschiedlichste Startereinheiten aus. Zu den derzeit ca. 170 Acyltransferasen, die keine Aminogruppen übertragen, zählen auch die Fettsäuresynthesen. Es werden außerdem drei Typen von PKS dazu gerechnet. Die Typen I und II kommen in Bakterien vor, Typ III in Pflanzen und Bakterien.

**Typ I:** Hierbei handelt es sich um Multienzymkomplexe. Diese bestehen aus einer Reihe von Modulen, die jeweils das aktive Zentrum für die Durchführung eines Biosyntheseschrittes enthalten. Als Beispiel gilt hier die Erythromycin-Synthase des Bakteriums *Saccharopolyspora erythraea*, die aus drei gigantischen multifunktionalen Polypeptiden (jeweils etwa 350 kDa) besteht (Pieper, 1995). Dieses Enzym benutzt als Starter Propionyl-CoA und als Kettenverlängerer Methylmalonyl-CoA (sechs Moleküle pro Molekül Erythromycin). Außerdem benötigt es NADPH.

**Typ II:** Sie sind iterative Multienzymkomplexe monofunktioneller Proteine. Im Gegensatz zu Typ I sind die Multienzymkomplexe vom Typ II dissoziierbar und nicht immer zusammenhängend im Genom kodiert. PKS II katalysieren z.B. die bakterielle Synthese von

Resistomycin in *Streptomyces resistomycificus* (Jakobi, 2004). Dieser Enzymkomplex kondensiert ein Malonyl-CoA (Starter) mit neun weiteren Malonyl-Resten unter Decarboxylierung (Verlängerer) und führt anschließend eine spezifische Zyklisierung zum Resistomycin durch.

Beide Typen benötigen ein Acylcarrierprotein zum Transport der sich bildenden Produktkette von einer Enzymfunktion zur nächsten.

**Typ III:** Sie sind traditionell die pflanzlichen Polyketidsynthasen (Isvet, 2008; Dayu Yu, 2012). Diese unterscheiden sich sehr stark von den PKS vom Typ I und II. Es handelt sich um kleine homodimere Proteine, deren Untereinheiten zwischen 40 und 45 kDa groß sind. Sie kooperieren im Unterschied zu den Typen I und II nicht mit einem Acylcarrier-Protein, da nur ein aktives Zentrum vorliegt und zwischen den Kondensationsreaktionen keine Oxidoreduktionen wie z.B. beim Erythromycin durchgeführt werden.

### 1.7.1 Struktur und Mechanismus der Polyketidsynthasen vom Typ III

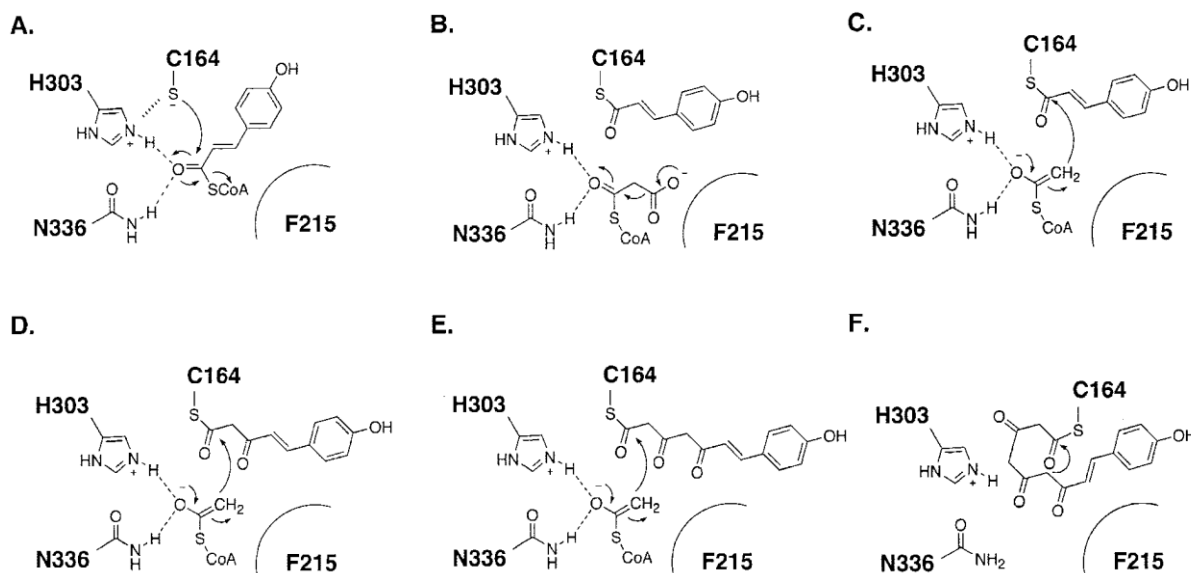
Im Jahre 1975 wurde zum ersten Mal eine „Flavanon-Synthase“ aus *Petroselinum hortense* gereinigt und die Eigenschaften dieses Enzyms wurden näher charakterisiert (Kreuzaler, 1975). Die erste Klonierung von Chalkon-Synthase (CHS)-Sequenzen erfolgte 1985 mit zwei Genen aus *Petunia hybrida* (Reif, 1985). Dies ermöglichte genauere Untersuchungen der Enzymaktivität und -spezifität sowie das Auffinden verwandter Enzyme durch molekularbiologische Methoden. Die erste Röntgenkristallstruktur einer CHS aus der Luzerne (*Medicago sativa*) (Ferrer et al., 1999) ermöglichte exakte Untersuchungen zum Mechanismus des Enzyms.

Mittlerweile wurde eine Reihe von weiteren Kristallstrukturen dieses Proteins mit verschiedenen Liganden und Mutationen sowie die Struktur der 2-Pyron-Synthase publiziert.

In Abb. 1.17 ist der Reaktionsmechanismus von Typ III-PKS für den ersten Kondensationsschritt zum Diketid-CoA dargestellt. Zunächst greift ein Cystein (in CHS aus *Medicago sativa* Aminosäure 164) das Carbonyl-Kohlenstoffatom einer Phenylpropan-Einheit an. Dabei wird HSCoA freigesetzt und die Phenylpropan-Einheit an das Enzym gebunden. Im zweiten Schritt wird Malonyl-CoA mit Hilfe von His303 und Asn336 gebunden und decarboxyliert. Das entstehende Acetyl-CoA-Anion greift anschließend am Carbonyl-Kohlenstoffatom der enzymgebundenen Phenylpropan-Einheit an, ein Diketid-CoA wird



gebildet und dabei vom Enzym abgespalten. Dieses Diketid wird anschließend wiederum von Cys164 gebunden, jetzt allerdings am früheren C-1 von Malonyl-CoA. Dann wiederholt sich bei Chalkon-Synthasen die Kondensation noch zweimal bevor das entstehende Tetraketid zyklisiert wird und das Produkt (bei CHS Naringenin-Chalkon) das Enzym verlässt.



**Abb. 1.17:** Vorgeschlagerener Reaktionsmechanismus zur Entstehung von Naringenin-Chalkon in der CHS von *Medicago sativa* (nach Ferrer et al., 1999)

Der prinzipielle Mechanismus der Kondensationsreaktion ist bei allen Typ III-PKS derselbe. Die verschiedenen PKS unterscheiden sich jedoch in dem Startermolekül, der Anzahl von Kondensationen, der Zyklisierungsweise und der Beteiligung einer Polyketidreduktase.

## 1.7.2 Beispiele für Typ III Polyketidsynthasen

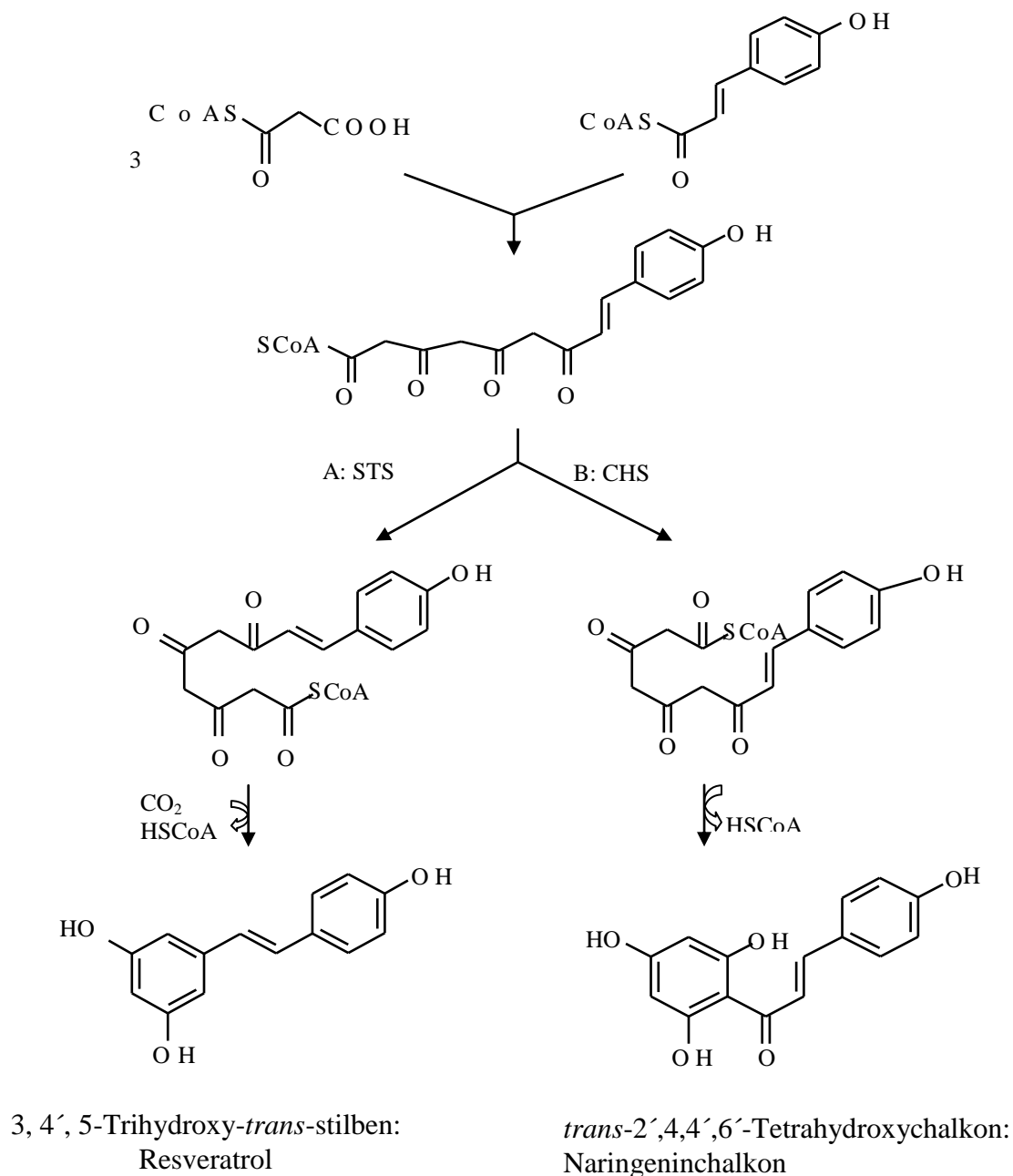
### 1.7.2.1 Chalkon-Synthase und Stilben-Synthase

Die CHS ist der Prototyp aller Typ III-PKS und mit ihm wurden die meisten Untersuchungen durchgeführt. CHS katalysiert die Synthese des C<sub>15</sub>-Grundgerüsts der Flavonoide, einer Gruppe von Sekundärstoffen, die ubiquitär in den Pflanzen vorkommen.

Als Startsubstrat der CHS dient *p*-Cumaroyl-CoA, welches mit drei Molekülen Malonyl-CoA zu einem Tetraketid kondensiert wird. Anschließend wird dieses Zwischenprodukt durch eine Claisen-Kondensation zu einem Naringenin-Chalkon zyklisiert (Abb. 1.18).

Die Stilben-Synthase (STS) nutzt denselben Starter wie die CHS und führt ebenfalls drei Kondensationen durch. Allerdings wird das entstehende Tetraketid in anderer Weise zyklisiert. Die Ringbildung erfolgt zwischen C-2 und C-7. Außerdem wird das entstandene Intermediat decarboxyliert (Abb. 1.18). Die erste STS-cDNA wurde aus *Pinus sylvestris* kloniert (Schröder et al., 1988). Die Funktion der Stilbene, z.B. Resveratrol, liegt in der Pathogenabwehr. Sie werden bei Pathogenbefall und Verletzung induziert und sind daher als Phytoalexine zu betrachten. Es wird angenommen, dass das Resveratrol für das „Französische Paradoxon“ verantwortlich ist, nämlich die antiatherosklerotische Wirksamkeit verschiedener Rotweine (Sielmann und Creasy, 1992).

Aus der Sequenzanalyse heraus ist es nicht möglich, Chalkon- und Stilben-Synthasen zu unterscheiden. Die einzelnen Stilben-Synthasen einer Pflanzengattung zeigen große Ähnlichkeit untereinander und sind den Chalkon-Synthasen derselben Gattung ähnlicher als den Stilben-Synthasen anderer Gattungen. Daher wurde angenommen, dass sich Stilben-Synthasen in der Evolution mehrfach aus Chalkon-Synthasen entwickelt haben (Tropf et al., 1995).



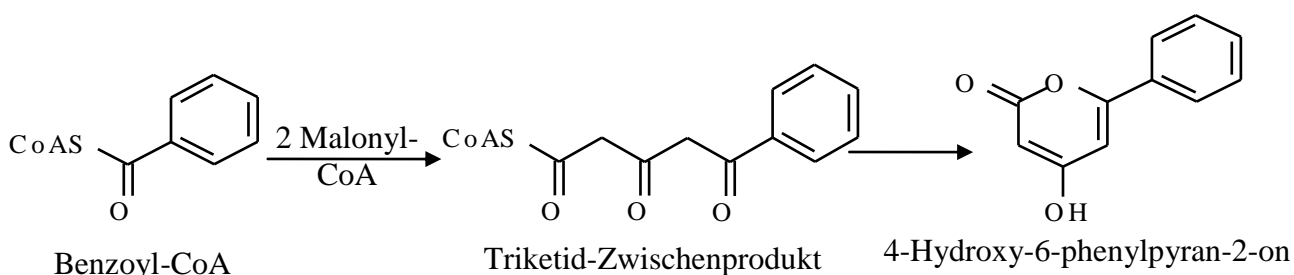
**Abb. 1.18:** Reaktionen von A: Stilben (STS)- und B: Chalkon-Synthase (CHS)

### 1.7.2.2 Benzophenon-Synthase und Biphenyl-Synthase

Die Benzophenon-Synthase (BPS) wurde das erste Mal in *Centaurium erythraea*-Zellkulturen (Gentianaceae) gefunden (Beerhues, 1996). Dort akzeptiert sie als Hauptsubstrat 3-Hydroxybenzoyl-CoA und bildet nach einer dreifachen Kettenverlängerung mit Malonyl-CoA

das Tetraketidzwischenprodukt. Nach anschließender Claisen-Kondensation bildet sich das 2,3',4,6-Tetrahydroxybenzophenon. Eine BPS-cDNA wurde zum ersten Mal aus *Hypericum androsaemum* kloniert und charakterisiert (Liu et al., 2003). Das Enzym ist ein Homodimer mit einer molekularen Masse der Untereinheiten von jeweils 42,8 kDa. Das bevorzugte Starter-Substrat ist Benzoyl-CoA. Nach dreifacher Elongation mit Malonyl-CoA entsteht das lineare Tetraketid. Es wird durch eine Claisen-Kondensation zum 2,4,6-Trihydroxybenzophenon, dem BPS-Hauptprodukt, zyklisiert und aromatisiert (Abb. 1.20). Dieses Produkt kann durch eine Cytochrom P450-Monooxygenase in 2,3',4,6-Tetrahydroxybenzophenon überführt werden. Beide Verbindungen sind Ausgangsstoffe für eine Vielzahl pharmakologisch relevanter Substanzen (z.B. Garcinol).

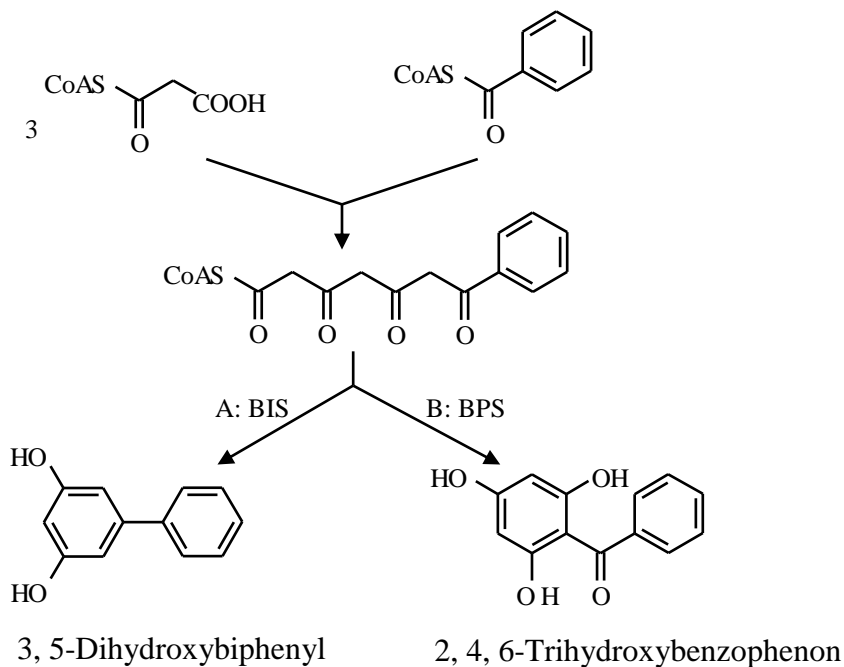
Bei den Inkubationen der BPS mit Benzoyl-CoA wird *in vitro* ein Nebenprodukt in Form eines Laktons beobachtet (Liu et al., 2003). Es entsteht nach zweifacher Kettenverlängerung und anschließendem Lakton-Ringschluss (Abb. 1.19).



**Abb. 1.19:** Bildung des BPS-Nebenprodukts 4-Hydroxy-6-phenylpyran-2-on

Die PKS III Biphenyl-Synthase (BIS) wurde zum ersten Mal in *Sorbus aucuparia*-Zellkulturen entdeckt (Liu et al., 2004). Sie ist erwähnenswert, da sie wie die Benzophenon-Synthase als Startersubstrat Benzoyl-CoA verwendet. Im Gegensatz zur Letzteren schließt sich allerdings nach der dreifachen Elongation mit Malonyl-CoA keine Claisen-Kondensation, sondern eine Aldol-Kondensation an (Abb.1.20). Bekannte Biphenyl-Derivate sind zum Beispiel das Aucuparin in *S. aucuparia* (Eberesche) sowie das Malusfuran in *Malus domestica* (Apfel). Beide Stoffe sind bedeutende Phytoalexine wirtschaftlich wichtiger Obst- und Zierbäume und somit interessante Forschungssubstanzen (Kokubun und Harborne, 1994; Kokubun und Harborne, 1995).

Somit stellen BPS und BIS die zentralen Elemente der Biosynthese der Benzophenone und Xanthone bzw. der Biphenyle und abgeleiteten Dibenzofurane dar. Die Biphenyl-Synthase unterscheidet sich von der Benzophenon-Synthase dadurch, dass sie eine Decarboxylierung und eine Stilben-Synthase-ähnliche Zyklisierung durchführt.

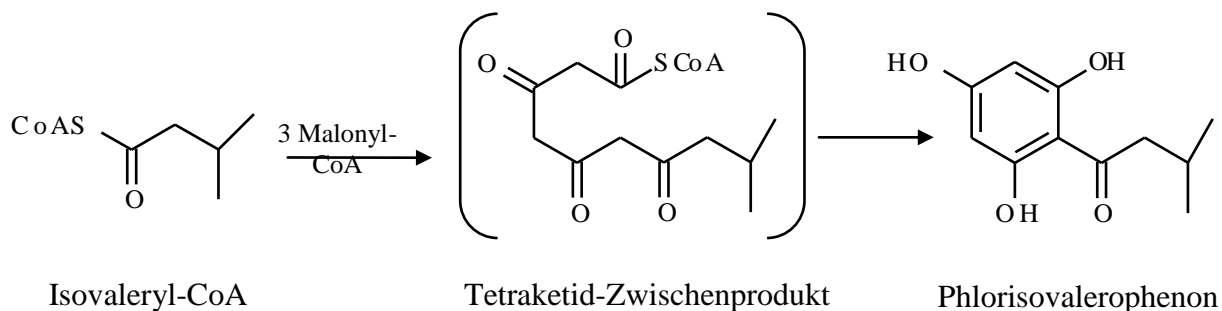


**Abb. 1.20:** Reaktionen von A: Biphenyl (BIS)- und B: Benzophenonsynthase (BPS) (Beerhues, 2009)

### 1.7.2.3 Valerophenon-Synthase

Die Valerophenon-Synthase (VPS), genauer Phlorisovalerophenon-Synthase genannt, ist ein Enzym, dessen cDNA zum ersten Mal aus Hopfen (*Humulus lupulus*) kloniert wurde (Zuurbier et al., 1998).

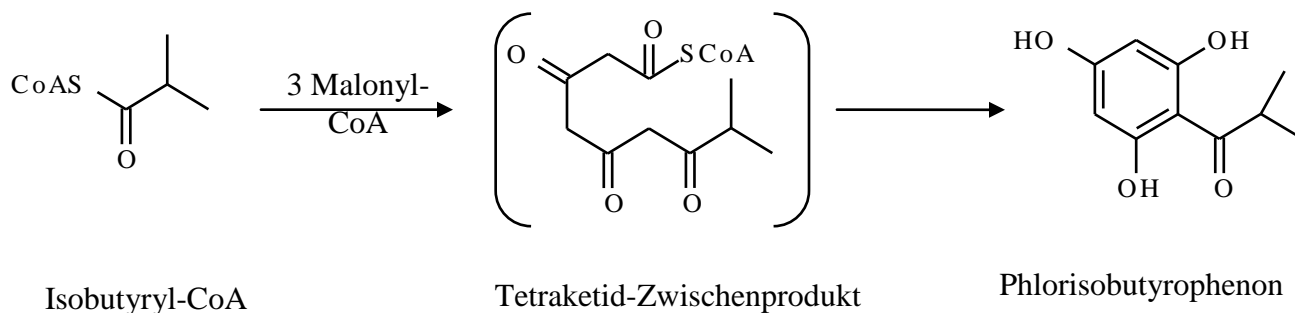
Als bevorzugtes Substrat akzeptiert sie Isovaleryl-CoA. Dieses wird mit drei Malonyl-CoA zu einem Tetraketidzwischenprodukt verknüpft. Nach einer Claisen-Kondensation entsteht Phlorisovalerophenon (Abb. 1.21). Aus ihm entstehen im Hopfen unter anderem die Hopfenbitterstoffe, zu denen Humulon und Lupulon zählen.



**Abb. 1.21:** Reaktion der Isovalerophenon-Synthase (VPS)

#### 1.7.2.4 Isobutyrophenon-Synthase

Eine weitere PKS vom Typ III ist die neben der CHS und der BPS in *H. perforatum* vorkommende Isobutyrophenon-Synthase (BUS). Für Forschungszwecke gibt es noch keine klonierte cDNA, aber das Enzym wurde eindeutig in Zellkulturen von *H. calycinum* nachgewiesen (Klingauf, 2004; Klingauf et al., 2005). BUS bildet das Grundgerüst des in *H. perforatum* wichtigen Inhaltsstoffs Hyperforin, dessen antidepressive Wirksamkeit belegt ist (Schulz, 2003). BUS katalysiert die Kondensation von drei Molekülen Malonyl-CoA mit einem Molekül Isobutyryl-CoA zu einem linearen Tetraketid. Anschließend erfolgt eine Zyklisierung über eine Claisen-Kondensation sowie eine Aromatisierung zum Endprodukt Phlorisobutyrophenon (Abb. 1.22).



**Abb. 1.22:** Reaktion der Isobutyrophenon-Synthase (BUS)

## 1.8 Zielsetzung

Die bekannten PKS Typ III aus *Hypericum* spec. sind die in *E. coli* aktive Chalkon-Synthase (CHS) und die Benzophenon-Synthase (BPS) von *H. androsaemum* (Liu et al., 2003) sowie die aktive CHS und die inaktive BPS von *H. perforatum* (Klingauf, 2004).

An der Entstehung der pharmakologisch wichtigen Inhaltsstoffe von *H. perforatum*, Hyperforin und Adhyperforin, ist eine weitere Polyketidsynthase Typ III, die Isobutyrophenon-Synthase (BUS), beteiligt (Klingauf, 2004; Klingauf et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit sollte die cDNA der Isobutyrophenon-Synthase aus *H. perforatum* (HpBUS) kloniert und in *E. coli* exprimiert werden. Anschließend musste das rekombinante Enzym bezüglich der molekularen und kinetischen Eigenschaften charakterisiert werden.

Nach dem Vergleich der Aminosäuresequenzen von HpBUS mit verschiedenen *Hypericum* BPS-Enzymen wurde die zielgerichtete Mutation angewendet, um Struktur - Funktionsbeziehungen zu untersuchen.

Zudem sollte mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung (ISH) die Lokalisierung von HpBUS-Transkripten in *H. perforatum*-Sprosskulturen untersucht werden, um die räumliche Expression mit dem Ort der Hyperforinbildung korrelieren zu können.

## 2 Material

### 2.1 Pflanzenmaterial

#### 2.1.1 Intakte Pflanzen

Pflanzen von *Hypericum calycinum* und *Hypericum perforatum* wurden im Arzneipflanzengarten des Instituts für Pharmazeutische Biologie der TU Braunschweig geerntet.

Für die Isolation von mRNA wurden Knospen und Blüten genutzt. Das Material wurde entweder sofort aufgearbeitet oder in kleinen Portionen in flüssigem Stickstoff eingefroren und für spätere Untersuchungen bei -80°C gelagert.

#### 2.1.2 Zellkulturen von *Hypericum calycinum*

In der Arbeitsgruppe bereits verfügbare Kalluskulturen von *H. calycinum* wurden zum Anlegen von Zellsuspensionskulturen in verschiedenen Medien benutzt (Abb. 2.1, 2.2).

Zusätzlich wurden Zellsuspensionskulturen selbst angelegt und auf zwei verschiedenen Medien kultiviert.



**Abb. 2.1:** Zellsuspensionskultur von *H. calycinum* in LS-Medium

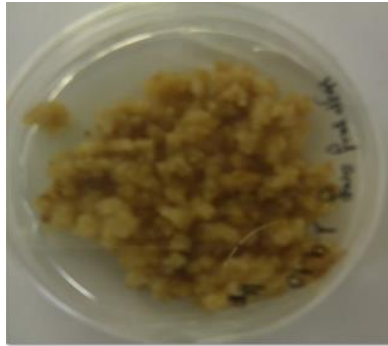


**Abb. 2.2:** Zellsuspensionskultur von *H. calycinum* in BDS-Medium

#### 2.1.3 Zellkulturen von *Hypericum perforatum* subsp. *angustifolium*

Die Kalluskulturen von *Hypericum perforatum* subsp. *angustifolium* (Abb. 2.3) wurden von Tocci (2012) hergestellt.



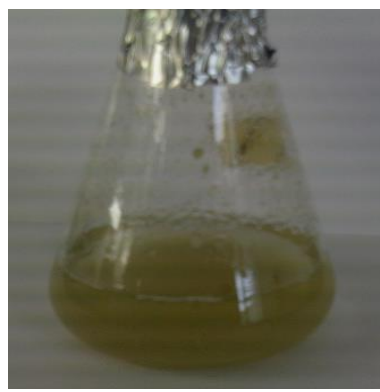


**Abb. 2.3:** Kalluskultur von *H. perforatum* subsp. *angustifolium* auf LS-Medium

Zur Elizitierung wurden Chitosan ( $25 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Abb. 2.4) und der Wechsel in BDS-Medium (Abb. 2.5) benutzt.



**Abb. 2.4:** Zellsuspensionskultur von *H. perforatum* subsp. *angustifolium* in LS-Medium



**Abb. 2.5:** Zellsuspensionskultur von *H. perforatum* subsp. *angustifolium* nach Elizitierung (BDS-Medium/Chitosan)

#### 2.1.4 Kultivierung von Kallus- und Zellsuspensionskulturen

Ungefähr 1 g Zellen einer Kalluskultur wurden unter sterilen Bedingungen in 50 ml Flüssigmedium im 250 ml Erlenmeyerkolben transferiert. Die Kulturen wurden unter Dauerlicht auf LS-Medium kultiviert. Alle drei Wochen wurde ein Teil der Zellmasse unter sterilen Bedingungen auf frisches Festmedium transferiert.

Alle Zellsuspensionen wurden auf einem Schüttler bei konstanter Temperatur von  $25^\circ\text{C}$  und im Dunkeln kultiviert. Falls keine definierte Einwaage nötig war, wurden die Zellkulturen im Abstand von 10 Tagen durch einfaches Verteilen eines Kolbeninhalts auf zwei bis drei neue Kolben mit je 50 ml frischem Flüssigmedium weiter kultiviert.

Für Klonierung und Enzymsätze wurden die Zellen abgenutscht. Jeweils 3 g Ausgangsmasse wurden in neues Nährmedium eingewogen. Diese Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen.

## 2.2 Chemikalien, Nährmedien, Lösungen und Puffer

### 2.2.1 Chemikalien, biochemische und molekularbiologische Reagenzien

Substanz	Bezugsquelle
Agar-Agar	Roth
Select Yeast Extract	Life Technologies
Select Peptone	Life Technologies
IPTG	Sigma Aldrich
Agarose NEEO Ultra	Roth
Acrylamid	Gibco-BRL
Bis-Acrylamid	Gibco-BRL
TEMED	Bio-Rad
Ammoniumpersulfat	Bio-Rad
SDS	Roth
Tris	Biosolve Ltd.
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat	Fluka
Coomassie brilliant blue R250	Merck
Coomassie brilliant blue G250	Merck
Orthophosphorsäure	Roth
Kaliumhydroxid	Fluka
Glycerol	Roth
$\beta$ -Mercaptoethanol	Fluka
Bromphenolblau	Aldrich
Methanol	Fisher-Scientific
Essigsäure	Roth
Ampicillin	Roth
Chloramphenicol	Fluka
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Imidazol	Roth
RNAse A	Fermentas
Chitosan	Roth
Kaliumacetat	Fluka
Formamid	Sigma-Aldrich
Ni-NTA Agarose	Qiagen
Saccharose	Fluka
X-Gal	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Diagnostic Chemicals Limited (dcl)
HEPES	Sigma-Aldrich
Seasand	Roth
Polyclar® AT	Serva
Isobutyryl-CoA	Sigma
Benzoyl-CoA	Sigma-Aldrich
Malonyl-CoA Lithiumsalz	Sigma-Aldrich
[2- <sup>14</sup> C] Malonyl-CoA	Amersham Biosciences
Isovaleryl-CoA	Sigma
Butyryl-CoA	Sigma
Hexanoyl-CoA	Sigma
Octanoyl-CoA	Sigma

p-Cumaroyl-CoA	Sigma
3-Hydroxybenzoyl-CoA	synthetisiert von Dr. B. Liu, AG Beerhues
4-Hydroxybenzoyl-CoA	synthetisiert von Dr. B. Liu, AG Beerhues
2-Hydroxybenzoyl-CoA	synthetisiert von Dr. B. Liu, AG Beerhues
Cinnamoyl-CoA	synthetisiert von I. Belhadj und Dr. I. Abdelrahman, AG Beerhues
Phlorbenzophenon	ICN
Phlorisobutyrophenon	synthetisiert von Dr. P. Klingauf, früher AG Beerhues
Prestained protein ladder (10-170 kDa)	Fermentas
Gene Ruler DNA Ladder Mix	Fermentas
Formamid	Roth
Tween-20	Fluka
tRNA	Roche
Poly(A)	Roche
Anti-Digoxine-AP	Roche
Nitro-blau-tetrazoliumchlorid	Roche
Levamisol	Sigma-Aldrich
5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat	Roche
Toluidinsalz	
Xylen	Sigma-Aldrich

2.2.2 Nährmedien für Pflanzengewebekulturen

Alle Medienbestandteile wurden, wenn nicht anders angegeben, in Reinstwasser gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert mit Natronlauge oder Salzsäure eingestellt. Mit Alufolie verschlossene Kolben mit 50 ml Medium wurden für 20 min bei 121 °C autoklaviert.

Medium	Zusammensetzung	Herstellung des Mediums und Verwendung
<b>BDS-Flüssigmedium</b> (modifiziertes B5 Medium; Gamborg et al, 1968; Dunstan und Short, 1977)	<b>I</b>	Stammlösungen mit 800 ml Wasser vereinigen. Saccharose darin lösen und pH auf 5,5 einstellen. Mit Wasser auf einen Liter auffüllen. Autoklavieren. Nährmedium für Zellsuspensionskulturen.
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	
	150 mg/l	
	KNO <sub>3</sub>	
	2530 mg/l	
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	
	320 mg/l	
	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
	230 mg/l	
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	
	134 mg/l	
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	
	247 mg/l	
	MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	
	13,2 mg/l	
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	
	2,0 mg/l	
	<b>II</b>	
	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	
	0,039 mg/l	
	KI	
	0,75 mg/l	
	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	
	0,025 mg/l	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	
	0,25 mg/l	
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	
	3,0 mg/l	
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	
	172 mg/l	
	<b>III</b>	
	FeSO <sub>4</sub>	
	27,85 mg/l	

	<div>TitriplexIII (Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>)37,25 mg/l</div> <div><b>IV</b> Nicotinsäure1,0 mg/l Thiaminiumdichlorid10,0 mg/l Pyridoxolhydrochlorid1,0 mg/l myo-Inosit100,0 mg/l</div> <div><b>V</b> Kinetin (6-Furfurylaminopurin)100 mg/l Dicamba7,5 mg/l (3,6-Dichloro-2-methoxybezoessäure)</div> <div><b>VI</b> Saccharose30 g/l</div>	
<div><b>LS-Flüssigmedium</b> (Linsmeier und Skoog, 1965)</div>	<div><b>I</b> KNO<sub>3</sub>1900 mg/l NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>1650 mg/l CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O40 mg/l MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O70 mg/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>170 mg/l</div> <div><b>II</b> MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O16,90 mg/l ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O0,60 mg/l KI0,83 mg/l H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>6,20 mg/l Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>0,25 mg/l FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O27,80 mg/l CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O0,025 mg/l CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O0,025 mg/l</div> <div><b>III</b> Titriplex III (Na<sub>2</sub> EDTA · 2H<sub>2</sub>O)41,30 mg/l</div> <div><b>IV</b> Myo- Inosit100,0 mg/l Thiaminiumchlorid0,4 mg/l</div> <div><b>V</b> 2,4-Dichlorphenoxy-Essigsäure0,90 µM 1-Naphtylessigsäure1,04 µM</div> <div><b>VI</b> Saccharose30,0 g/l</div>	<div>Stammlösungen mit 800 ml Wasser vereinigen. Saccharose darin lösen und mit Wasser auf einen Liter auffüllen. pH von 6,0 bis 6,3 mit konzentrierter NaOH einstellen. Autoklavieren. Nährmedium für Zellsuspensionskulturen.</div>
<div><b>LS-Festmedium</b></div>	<div>siehe LS-Flüssigmedium, aber mit Zusatz von 8,0 g/l SELECT Agar unter Erwärmung des Mediums auf ca. 80 °C.</div>	<div>Kulturmedium für Pflanzenkalli.</div>

2.3 Lösungen und Puffer für biochemische Untersuchungen

Puffer zur Extraktion und Enzyminkubation

Bezeichnung	Zusammensetzung	Herstellung und Lagerung
0,1 M Tris-HCl Puffer pH 7-9	Tris-HCl 1,21g Reinstwasser ad 100 ml	pH-Wert mit cc. HCl einstellen
0,1 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Puffer pH 5-6,5	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,36g Reinstwasser ad 100 ml	pH-Wert mit KOH einstellen
0,1 M HEPES-Puffer pH 8,0 + 0,1 mM DTT	HEPES 2,4g DTT 0,154g Reinstwasser ad 100 ml	pH mit 1N NaOH einstellen, DTT immer frisch zugeben

Lösung zur Regeneration der PD<sub>10</sub>- Säulen (Amersham Bioscience)

Bezeichnung	Zusammensetzung	Herstellung und Lagerung
NaOH Stammlösung	NaOH 1M	die Lösung vor Gebrauch 8:50 mit bidest. Wasser verdünnen.

Lösungen zur Enzyminkubation

CoA Ester	Stammlösung	Bemerkungen
Malonyl-CoA	2 mg/ml	Für Standardinkubationen vor Gebrauch 1:5 verdünnt
Benzoyl-, Isobutyryl-, Isovaleryl-, Butyryl-, Hexanoyl-, Octanoyl-, 3-Hydroxybenzoyl-, 2- Hydroxybenzoyl-, 4- Hydroxybenzoyl-, Cinnamoyl-, <i>p</i> - Cumaroyl-, Acetyl-CoA	2 mg/ml	Für Standardinkubationen vor Gebrauch 1:10 verdünnt

Puffer zur Extraktion und Enzymreinigung mittels Ni-NTA Agarose

Bezeichnung	Zusammensetzung	Herstellung und Lagerung
Lysispuffer	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 50 mM NaCl 300 mM Imidazol 10 mM Reinstwasser 250 ml	mit frischer NaOH-Lösung auf pH 8,0 einstellen, bei 4°C lagern
Waschpuffer	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 50 mM NaCl 300 mM Imidazol 80 mM Reinstwasser 250 ml	mit frischer NaOH-Lösung auf pH 8,0 einstellen, bei 4°C lagern
Elutionspuffer	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 50 mM NaCl 300 mM Imidazol 250 mM Reinstwasser 250 ml	mit frischer NaOH-Lösung auf pH 8,0 einstellen, bei 4°C lagern

Bestimmung des Proteingehaltes

Bezeichnung	Zusammensetzung	Herstellung und Lagerung
Bradford Lösung	Coomassie®-Brilliant blue G-250 100 mg Ethanol 96% 50 ml o-Phosphorsäure 100 ml Reinstwasser ad 1000 ml	Coomassie in Ethanol lösen, Phosphorsäure zugeben und mit Wasser auf 1,0 Liter auffüllen, nach Filtration bei 4°C lagern

Puffer und Lösungen für die SDS-Gelelektrophorese

Bezeichnung	Zusammensetzung	Herstellung und Lagerung
Sammelgel (5% )	Reinstwasser 3,4ml 0,5M Tris-HCl, pH 6,8 0,63ml Acrylamid/Bis 30% 0,83ml 10% (w/v) SDS 0,05ml 10% (w/v) APS 0,05ml TEMED 5µl	
Trenngel (12%)	Reinstwasser 3,3ml 1,5M Tris-HCl, pH 8,8 2,5ml Acrylamid/Bis 30% 4,0ml 10% (w/v) SDS 0,1ml 10% (w/v) APS 0,1ml TEMED 4µl	
Probenpuffer	Reinstwasser 2,7ml 0,5M Tris-HCl, pH 6,8 1,0ml Glycerin 2,0ml 10% (w/v) SDS 3,3ml β-Mercaptoethanol 0,5ml 0,5% (w/v) Bromphenolblau 0,5ml	bei 4°C lagern
10x Laufpuffer	Tris 15g Glycin 72g Na-SDS 5g Reinstwasser ad 500ml	bei 4°C lagern, vor Gebrauch 1:10 verdünnen
Färbelösung	Coomassie blue R-250 25ml Stammlösung Methanol 100ml Essigsäure 20ml Reinstwasser ad 200ml	
Coomassie blue R-250 Stammlösung	Coomassie blue R-250 0,5g Reinstwasser ad 50 ml	Farbstoff in Wasser lösen und anschließend filtrieren
Entfärber	Methanol 30ml Essigsäure 20ml Reinstwasser ad 200ml	

2.4 Lösungen, Puffer und Nährmedien für die Molekularbiologie

2.4.1 Medien zur Kultivierung von *E. coli*

Bezeichnung	Zusammensetzung		Herstellung und Lagerung
LB-Medium	Bacto-Pepton	10 g	auf pH 7 einstellen, anschließend autoklavieren
	Hefe-Extrakt	5 g	
	NaCl	10 g	
	Reinstwasser	ad 1000 ml	
SOC Medium	Bacto-Pepton	5 g	autoklavieren und abkühlen lassen.
	Yeast-Extrakt	0,5 g	
	1 M NaCl	1,0 ml	Aliquotieren und bei - 20°C lagern
	1 M KCl	0,25 ml	
	Reinstwasser	97ml	
anschließend hinzufügen:			
	2 M Mg <sup>2+</sup> -Stammlösung	1,0 ml	
	2 M Glucose	1,0 ml	
	Reinstwasser	ad 100 ml	

Für die Herstellung der Festmedien wurde vor dem Autoklavieren 1,5% Agar zugesetzt.

2.4.2 Lösungen für die Transformation und Selektion von *E. coli*

Bezeichnung	Zusammensetzung		Herstellung und Lagerung
0,5 M IPTG Lösung	IPTG	6 g	sterilfiltrieren und bei -20 °C lagern
	Reinstwasser	ad 500 ml	
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktosid	100 mg	in Aluminiumfolie einpacken und bei -20 °C lagern
	N,N'-Dimethylformamid	2 ml	

2.4.3 Antibiotika

Bezeichnung	Zusammensetzung		Herstellung und Lagerung
Ampicillin	Ampicillin	100 mg	sterilfiltrieren und bei -20 °C lagern
	Reinstwasser	ad 1 ml	
Chloramphenicol	Chloramphenicol	30 mg	bei -20 °C lagern
	Ethanol 100 %	ad 1 ml	

2.4.4 Puffer und Lösungen für die DNA-Gelelektrophorese

Bezeichnung	Zusammensetzung		Herstellung und Lagerung
50x TAE	Tris	2 M	mit Eisessig auf pH 8 einstellen
	EDTA	0,05 M	
TBE-Puffer (für Sequenziergele)	Tris	90 mM	
	Borsaure	90 mM	
	EDTA	2 mM	
Ladepuffer (zum	25 mM EDTA	1,0 ml	Formamid mit Harz trocknen

Sequenzieren)	Formamid	5,0 ml	
	Dextranblau	0,1 mg	
Sequenziergel	Harnstoff	9 g	
	10x TBE-Puffer	3,0 ml	
	Reinstwasser	11,5 ml	
	30 % Acrylamid	3,75 ml	
	TEMED	0,01 ml	
	10 % (w/v) APS	230 µl	

2.4.5 Puffer für die Plasmidisolierung

Bezeichnung	Zusammensetzung		Herstellung und Lagerung
Puffer P1	Tris-HCl	50 mM	Tris- und EDTA-Lösung werden sterilfiltriert und gemischt, pH 8,0 einstellen, RNase A wird frisch zugegeben
	EDTA	10 mM	
	RNase A	100 µg/ml	
Puffer P2	NaOH	0,2M	Autoklavieren
	SDS	1% (w/v)	
Puffer P3	Kaliumacetat	2,55 M	pH 5,5 mit Eisessig einstellen und autoklavieren
TE-Puffer	Tris-HCl	10 mM	für genomische DNA auf pH 8,0 einstellen; für Plasmide auf pH 7,6
	EDTA	1 mM	

2.4.6 Puffer für die *in situ*-Hybridisierung

Bezeichnung	Zusammensetzung		Herstellung und Lagerung
DMPC-Wasser	Wasser	1 L	über Nacht bei 37°C lassen, danach durch Autoklavieren Reste von DMPC entfernen
	Dimethylpyrocarbonat (DMPC)	1 ml	
10x PBS-Puffer	NaCl	1.3 M	auf pH 7.4 einstellen
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	70 mM	
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30 mM	
Fixierungslösung	Paraformaldehyd	4% (w/v)	
	Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	15%	
	PBS-Puffer	X ml	
	Tween-20	0.1% (v/v)	
20x SSC	NaCl	3 M	auf pH 7.0 einstellen
	Na-Citrat	300 mM	
ALP-Puffer	Tris-HCl	0.1 M	auf pH 9.5 einstellen
	NaCl	0.1 M	
	MgCl <sub>2</sub>	50 mM	
	Tween-20	0.1%	



Hybridisierungsmix	50 % Formamid in 5x SSC 0.1% Tween-20		
komplett Hybridisierungsmix	Hybridisierungsmix	X ml	
	tRNA	150 µg/ml	
	Poly(A)	500 µg/ml	
50% Formamid	Formamid in 2x SSC	50% (v/v)	
	Tween-20	0.1% (v/v)	
BSA-Puffer	PBS-Puffer	X ml	
	Tween-20	0.1% (v/v)	
	BSA	1% (w/v)	
Anti-DIG-Antikörperlösung	BSA-Puffer Anti-Digoxine-AP	X ml verdünnt 1:2000	Mit Aluminonumfolie eingepackt und bei 4°C für 3 Stunden inkubieren lassen (immer frisch vorbereitet)
Farblösung	Nitro-blau-tetrazoliumchlorid (NBT)	2,25 µl/L	
	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat Toluidinsalz (BCIP)	1,75 µl/L	
	Levamisol	2 mM/L	

2.5 Enzyme

DNA-Synthese	Taq-DNA-Polymerase	Fermentas
	Pfu-DNA-Polymerase	Fermentas
	M-MuLV -Reverse Transkriptase	Fermentas
	RevertAid <sup>TM</sup> H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase	Fermentas
	PrimeScript <sup>TM</sup> Reverse Transcriptase	TAKARA BIO INC.
Restriktion	EcoRI, KpnI, NheI, EcoRV, DpnI	Fermentas
Weitere Enzyme	T4-Ligase	Fermentas
	RNAse A	Fermentas
	RNAse H	Fermentas
	RiboLock RNase Inhibitor	Fermentas

2.6 Kits

RNA-Isolierung	Rneasy <sup>®</sup> Plant mini kit	Qiagen
DNA-Isolierung und Reinigung	Dneasy <sup>TM</sup> plant maxi kit	Qiagen
	innuPREP DOUBLE pure kit (DNA-Gelextraktion und Aufreinigung von PCR Produkt)	Analytic Jena Biometra
Sequenzierung	BigDye <sup>®</sup> Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Appl. Biosystems

<i>in vitro</i> Transkription	<i>mirVana</i> <sup>TM</sup> miRNA Probe Construction Kit	Life Technologies
Resin	Technovit®7100 Kit Technovit®3040 Kit	Heraeus-Kulzer

2.7 Bakterienstämme und Plasmide

2.7.1 Bakterienstämme

<i>E.coli</i>	Relevante Eigenschaften
DH 5α	Fϕ80δ <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> end A1 <i>hsdR</i> 17(rk-mk+) <i>supE</i> 44 <i>thi</i> -1 λ- <i>gyrA</i> 96 <i>relA</i> 1 Δ( <i>lacZYA</i> -argFV169) <i>deoR</i>
BL21(DE3)pLysS	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdSB</i> ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> ) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysS (Cam <sup>R</sup> )

2.7.2 Vektoren

Plasmid	Quelle	Eigenschaften
pGEM <sup>®</sup> -T easy	Invitrogen	3kb T-Überhangvektor mit <i>lacZ</i> und Ampicillinresistenz
pRSet-B	Invitrogen	2,9 kb Überexpressionsvektor mit N-Terminal His <sub>6</sub> -Tag zur Proteinreinigung und Ampicillinresistenz

2.8 Nukleotide

dNTP	dATP	100 mM	Fermentas
	dCTP	100 mM	Fermentas
	dGTP	100 mM	Fermentas
	dTTP	100 mM	Fermentas
Nukleotide	Längenstandards 100 bp DNA-Leiter		Fermentas
	Gene Ruler DNA-Ladder Mix		Fermentas

2.9 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg) im Auftrag synthetisiert. Die lyophilisierten, salzfreien Oligonukleotide wurden in HPLC-Wasser gelöst. Die Endkonzentration betrug 100 pmol/μl.

2.9.1 SMART II-RACE Primer

SMART II	5`-AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA CGC GGG-3`
3`CDS	5`-AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA C(T) <sub>30</sub> N <sub>1</sub> N-3`
5`CDS	5`-(T) <sub>25</sub> N <sub>1</sub> N- 3`
RACE-Short	5`-CTA ATA CGA CTC ACT ATA AGG GC-3`
RACE-Long	5`-CTA ATA CGA CTC ACT ATA AGG GCA AGC AGT GGT AAC

AAC GCA GAG T-3`

RACE-Nested 5'-AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GT-3`

Die 3'CDS und 5'CDS Primer besitzen zwei variable Basen (N<sub>1</sub>N). Dadurch können sie spezifischer mit dem Anfang des Poly(A)-Restes der mRNA hybridisieren (Liang et al., 1993).

### 2.9.2 Degenerierte Primer für PKS

pd 0	5` -AA(AG) GCI AT(ACT) AA(AG) GA(AG) TGG GG- 3`
pd 1	5` -GCI AT(ACT) AA(AG) GA(AG) TGG GGI- 3`
pd 2	5` -ATG ATG TA(CT) CA(AG) CA(AG) GGI TG- 3`
pd 3	5` -CCI CCI GG(AG) TGI GC(AGT) ATC- 3`
pd 4	5` -AAI CC(AG) AAI A(AG)I ACI CCC C- 3`
pd 5	5` -(CT)(AT)I GGI TG(CT) (GT)(ACT)I GCI GGI- 3`
pd 6	5` -ATI C(GC)I (GC)(GT)I CCI CCI GG(AG) TG- 3`
5`BPSdsense	5` -ATG GCI CCI GCI ATG GA(AG) TA(CT)- 3`
5`CHSdsense	5` -ATG GTI ACI GTI GA(AG) GA(AG) GTI- 3`

I: Inosin

### 2.9.3 Primer um HpBUS zu amplifizieren

HpBUS f1	5` -GGC ACT GCA CTC CGT GTT- 3`
HpBUS f2	5` -TCT CAG ACG GAG CGG CC- 3`
HpBUS f3	5` -GGC GAT AAC GGC GCA CTT CTA- 3`

### 2.9.4 Primer um HcPKS1 zu amplifizieren

HcPKS1 Reverse	5`-TCATAGGCATAGGCTTCGAAGAAG-3`
HcPKS1 Forward	5`-TGCCTGAAGGATGTCTAACTTGG-3`
HpPKS1 Forward	5`-ATG TCT AACT TGG AGA CCA ATA GCT- 3`
HpPKS1 Reverse	5`- CTA GGC GGC GGC CTG- 3`

### 2.9.5 Primer um 5`ORF1 zu amplifizieren

HcORF1 Reverse1	5`-GGA AGA GGG GTT TCT CGA GG-3`
HcORF1 Reverse2	5`-TCT CCT CCG TCA GGT GCA TGT AC-3`
HcORF1 Reverse3	5`-CGG CGA CCA GTA GTC GCA CAT CTT A-3`

2.9.6 Überexpressionsprimer

HpBUS	HpBUS <i>NheI</i>	5´ -ATG <b>GCT AGC</b> ATG GCG CCT GCT ATG GAA TAC TC- 3´
	HpBUS <i>KpnI</i>	5´ -ACA <b>GGT ACC</b> CTA GTG CAG GAT GGG GAC AC- 3´
HcORF1	HcORF1 <i>NheI</i>	5´ -ATG <b>GCT AGC</b> ATG GCA CCC TCC ATC GAG- 3´
	HcORF1 <i>KpnI</i>	5´ -ACA <b>GGT ACC</b> CTA GGC GGC GGC CTG- 3´
HcPKS1	HcPKS1 <i>NheI</i>	5´ -ATG <b>GCT AGC</b> ATG TCT AACT TGG AGA CCA ATA GCT-3´
	HcPKS1 <i>KpnI</i>	5´ -ACA <b>GGT ACC</b> TCA TAG GCA TAG GCT TCG AAG AAG- 3´

Die Restriktionsschnittstellen sind rot markiert.

2.9.7 Vektor-Primer

pGEM-T easy	T7	5´ -TTG TAA TAC GAC TCA CTA TAG-3´
	Sp6	5´ -GAT TTA GGT GAC ACT ATA GAA TAC-3´
pRSET B	Forward	5´ -GAG ACC ACA ACG GTT TCC CTC-3´
	Reverse	5´ -CTA GTT ATT GCT CAG CGG TGG-3´

2.9.8 TATA Box degenerierte Primer

5´ -GAT TCT AGA (CT)(CT)I CTA TA(AT) A(AT)A (GC)(AC)-3´

2.9.9 Mutationsprimer

Das unterstrichene Basentriplett zeigt die zur cDNA der Wild-Typ HpBUS veränderte Stelle an.

T277P	T277P Sense	5´ –TAC TTC CTA AAG GAG GAC GTC ATT <u>CCT</u> CTC TTC AGG GAC AAC ATC- 3´
	T277P Anti-sense	5´ –GAT GTT GTC CCT GAA GAG <u>AGG</u> AAT GAC GTC CTC CTT TAG GAA GTA- 3´
T68L	T68L Sense	5´ –ATA TGT GTT AAG TCT CAT ATT AGG AAG AGG CAC TTC TAC <u>CTG</u> ACG- 3´
	T68L Anti-sense	5´ –CGT <u>CAG</u> GTA GAA GTG CCT CTT CCT AAT ATG AGA CTT AAC ACA TAT- 3´
I176V	I176V Sense	5´ –GCT GGG GGC ACG GCT CTC CGT <u>GTC</u> GCC AAG GAC CTC GCC GAG AAC- 3´
	I176V Anti-sense	5´ –GTT CTC GGC GAG GTC CTT GGC <u>GAC</u> ACG GAG AGC CGT GCC CCC AGC- 3´

T135L	T135L Sense	5' –GAT CAC CCA CGT GGT GTT TGC GAC CCT <u>CTC</u> CGG GTT CAT GAT GCC CGG C- 3'
	T135L Anti-sense	5' –G CCG GGC ATC ATG AAC CCG <u>GAG</u> AGG GTC GCA AAC ACC ACG TGG GTG ATC-3'

2.9.10 Primer für *in situ*-Hybridisierung

HpBUS	5'-CGGGTCCCGACGCTGCCTCGGGGGG <b>CCTGTCTC</b> -3'
HpaBPS	5'-CCGAGCCAAACCCTTGGTCGGGA <b>CCTGTCTC</b> -3'
Rot: T7 Promotor Primer	

2.10 Geräte

Gerät	Name	Hersteller
Autoklav	Vx-120	Systec GmbH Laborsystemtechnik
Elektrophorese	Mini-sub <sup>®</sup> Cell GT	BioRad
	Wide Mini- sub <sup>®</sup> Cell GT	BioRad
	Power Pac 300	BioRad
	Protein-Kammer	Biometra
Gelkammer		BioRad
Geldokumentation	Multimage <sup>™</sup> Light Cabinet	Alpha Innotech Corporation
Gefriertrockner	Alpha	Christ
Mikrowelle	Optimo	Moulinex
PCR-Thermoblock	T-Personal	Biometra
	Professional Gradient	Biometra
pH-Meter	Digital pH Meter 325	WTW
Photometer	Ultraspec 1000	Pharmacia Biotech
Reinluft	LaminAir HLB 2472	Heraeus
Reinstwasser	Milli-Q Reagent	Water Millipore
Speed Vaccum	RVC2-18	Christ
Sequenzierer	ABI Prism 377	Appl. Biosystems
Schüttler	HT	Infors
		Binder
Temperierung	Dri-Block <sup>®</sup> DB 30	Techne
HPLC	1200 Series	Agilent Technologies
	Degasser JP 60800795	Agilent Technologies
	Bin Pump DE 63055983	Agilent Technologies
	ALS DE 630557607	Agilent Technologies
	TCC DE 63058109	Agilent Technologies
	DAD DE 63056465	Agilent Technologies
Radioaktiv-HPLC	Agilent 1200 Series	Agilent Technologies
LC-MS (ESI-MS)	3200 Q TRAP	Appl. Biosystems
Inkubator	HT	Infors
Heizblock	Dri-Block DB 3D	Techne
Zentrifugen	Universal 32R	Hettich
	Biofuge 13	Heraeus Sepatech

---

Vakuumkonzentrator	Genelac SF 50	Biometra
Vortex	VF2	J. & K. Labortechnik
Waagen	Analysen- und Feinwaage	Sartorius
Wasserbad	Typ 3041	Köttermann
	Exatherm U3	Julabo
pH-Meter	Digital pH meter 325	WTW (wissenschaftlich technische Werkstätten)

### 3 Methoden

#### 3.1 Molekularbiologische Methoden

##### 3.1.1 Anzucht und Kultivierung von *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli* erfolgt im LB-Medium (2.4.1). Für Transformationen wird *E. coli* in SOC-Medium angezogen und auf festem LB-Medium ausplattiert, um Einzelkolonien zu erhalten. Diese werden für Plasmidpräparationen über Nacht in 5 ml LB-Medium kultiviert. Für die Proteinüberexpression wird *E. coli* in 100 ml LB-Medium in einem Inkubationsschrank bei 37 °C auf einem Rundschüttler angezüchtet. Die Proteinexpression erfolgt bei 25 °C. Bei allen Schritten wird zur Selektion der Bakterien das jeweilige Antibiotikum hinzu gegeben.

##### 3.1.2 Design von Oligonukleotiden

Die in der Arbeit verwendeten Primer (2.9) wurden von der Firma MWG-Biotech synthetisiert. Die für die Fragmentsuche eingesetzten degenerierten Primer und die anschließend verwendeten genspezifischen Primer hatten in der Regel eine Länge von 18-25 Basenpaaren und einen Schmelzpunkt von 55-65 °C. Der GC-Gehalt betrug, wenn möglich, 40-60 %.

Die Mutationsprimer (2.9.9) haben eine Länge von bis zu 50 Basen, wobei der Schmelzpunkt bei ca. 72 °C oder höher liegt.

##### 3.1.3 Einbau von Restriktionsschnittstellen in Primer

Bei der Konstruktion der Primer für die Amplifikation von offenen Leserahmen (ORF) wurden Restriktionsschnittstellen eingebaut. Diese Restriktionsschnittstellen wurden der jeweiligen multiplen Klonierungsstelle (MCS) des Expressionsvektors für eine gerichtete Ligation angepasst und waren am 5'-Terminus durch drei angehängte Nukleotide geschützt. Bei der Klonierung in Vektoren, die für ein Fusionsprotein kodieren, ist auf die Einhaltung des Leserasters zu achten. Die Schnittstellen müssen im Primer so lokalisiert sein, dass es nach der Ligation des Inserts in den Vektor an der Fusionsstelle zu einem rastergenauen

Übergang des Triplettcodes kommt. Die veränderten Hybridisierungsbedingungen von Primer und Matrize müssen dabei berücksichtigt werden.

### **3.1.4 Isolierung von Gesamt-RNA**

Die Isolierung von gesamt-RNA wurde sowohl aus Suspensionskulturen als auch aus nativem Pflanzenmaterial mit Hilfe des RNeasy® Mini Kits (2.6) durchgeführt. Dazu wurde Pflanzenmaterial mit flüssigem Stickstoff in einem Mörser zu einem feinen Pulver zermahlen. 100 mg des Pulvers wurden in Extraktionspuffer gelöst, durch Filtration von zellulären Bestandteilen befreit und an eine Kieselgelmatrix adsorbiert. Nach Verdau von DNA durch DNase I wurde die RNA auf der Matrix gewaschen und abschließend mit RNase-freiem Wasser eluiert. Die gewonnene gesamt-RNA wurde direkt für die reverse Transkription eingesetzt oder bei -80 °C gelagert.

### **3.1.5 Isolierung von genomischer DNA**

Genomische DNA aus Pflanzen wurde mit Hilfe des DNeasy Systems der Firma Qiagen® gewonnen. Dabei wurden 100 mg Pflanzen-Material in flüssigem Stickstoff gemörsert, in 400 µl AP1 Puffer + 4 µl RNase A gelöst und 10 Minuten bei 56 °C inkubiert. Die folgenden Reinigungs- und Waschschrte erfolgten analog dem DNeasy-Protokoll. Die genomische DNA wurde anschließend mit 100 µl AE Puffer eluiert und direkt verwendet oder bei -20 °C gelagert. Die DNA-Konzentration wurde bestimmt.

### **3.1.6 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäure-Lösungen**

Die Konzentrationsmessung von RNA bzw. DNA erfolgte im UV-Spektrometer bei 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren. Die optische Dichte (OD) von 1 entspricht einer Konzentration von 40 µg/ml RNA bzw. einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Unter Berücksichtigung einer eventuellen Verdünnung wurde die Konzentration der isolierten RNA wie folgt berechnet:

$$OD_{260nm} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor}/1000 = \mu\text{g RNA}/\mu\text{l}$$

$$OD_{260nm} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}/1000 = \mu\text{g DNA}/\mu\text{l}$$

Zur Bestimmung der Reinheit wurde außerdem die OD bei 280 nm gemessen. Dort liegt das Absorptionsmaximum aromatischer Verbindungen (z.B. aromatischer Aminosäuren, Phenole). Über den Quotienten der OD bei 260 und 280 nm ( $OD_{260nm}/OD_{280nm}$ ) lässt sich eine Aussage über die Reinheit der Nukleinsäure-Lösung machen. Optimal ist ein Quotient

zwischen 1,8 und 2,0, während kleinere Werte auf die Anwesenheit von Proteinen hinweisen. Werte über 2,0 zeigen Salz- oder Nukleotidverunreinigungen an, die z.B. aufgrund eines Abbaus von RNA durch RNAsen entstanden sind (Scrimpf 2002).

**3.1.7 Reverse Transkription (RT)**

Die mRNA musste zunächst in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Die Umschreibung erfolgte durch eine Reverse Transkriptase. Das ist eine aus Viren stammende DNA-Polymerase, deren Fähigkeit ausgenutzt wurde, einzelsträngige mRNA als Matrize zu verwenden, um von dieser eine DNA-Kopie zu erstellen.

Die entstandene cDNA wurde sofort als Template eingesetzt oder der Ansatz bis zu seiner Verwendung bei -20°C gelagert.

**3.1.7.1 cDNA-Synthese mittels M-MuLV Reverse Transcriptase**

Gesamt-RNA (10 ng - 5 µg) diente als Matrize für die cDNA-Erststrang-Synthese. Für die Standard reverse Transkription wurde 1 µg Gesamt-RNA als Matrize verwendet und diese mittels RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase der Firma Fermentas bei 42 °C in cDNA transkribiert. Diese Enzyme basieren auf einer Moloney-Murine Leukemia Virus-Reversen Transkriptase (M-MuLV-RT).

Erststrang-cDNA-Synthese wurde darüber hinaus mit diesen reversen Transkriptasen ohne (TdT)-Aktivität durchgeführt. Die RNase-Aktivität dieses Enzyms war durch eine Punktmutation in der H-Domäne unterbunden. Für die cDNA-Synthese wurden bis zu 1 µg Gesamt-RNA verwendet und die Reaktion wurde mit Oligo dT-Primern, Random-Primern oder genspezifischen Primern nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Folgende Komponenten wurden in einem PCR Reaktionsgefäß gemischt, 5 min bei 70 °C inkubiert und anschließend auf Eis platziert (2 min).

**3'-CDS-cDNA Synthese**

Komponente	Volumen
Gesamt-RNA (1 µg)	x µl
3'-CDS Primer (10 pmol/µl)	1 µl
Nukleasen-freies Wasser bis	10 µl



**5'-CDS-cDNA Synthese**

Komponente	Volumen
Gesamt-RNA (1 µg)	x µl
Smart II oligo Primer (10 pmol/µl)	1 µl
5'-CDS Primer (10 pmol/µl)	2 µl
Nukleasen-freies Wasser bis	10 µl

Danach wurden zu beiden Ansätzen folgende Komponenten zupipettiert:

Komponente	Volumen
5x Reaktionspuffer	4 µl
RNase-Inhibitor (40 Units/µl)	1 µl
10 mM dNTP Mix	2 µl
H Minus M-MuL V RT (200 U/µl)	1 µl
Nukleasen-freies Wasser bis	20 µl

Die Ansätze wurden bei 42 °C für 60 min, dann bei 70 °C 15 min inkubiert.

**3.1.7.2 cDNA-Synthese mittels PrimeScript™ Reverse Transcriptase**

Mit Hilfe von PrimeScript™ Reverse Transcriptase der Takara BIO INC wurden 3'-RACE-cDNA- und 5'-RACE-cDNA-Synthesen durchgeführt. Die Terminal-Nukleotid-Transferase-Aktivität (TdT) der reversen Transkriptase erlaubt dabei die Verlängerung der Matrizen-RNA um den SMART II-Primer durch Anfügen von Desoxycytidinresten an die neu gebildete cDNA. Die so um eine bekannte Sequenz 5'-terminal erweiterte cDNA kann für die 5'-RACE-PCR verwendet werden. cDNA-Synthese mittels 3'CDS-Primer wurde für die Aufklärung der 3'-Termini mit Hilfe der 3'-RACE-PCR durchgeführt. Als 3'-CDS-Primer diente ein um die SMART II- Sequenz erweiterter Oligo(dT)-Primer.

Folgende Komponenten wurden in einem PCR-Reaktionsgefäß gemischt, 5 min bei 65 °C inkubiert und anschließend auf Eis platziert (2 min).

**3'-RACE-cDNA Synthese**

Komponente	Volumen
1 µg Gesamt-RNA	x µl
3'-CDS Primer (10 pmol/µl)	1 µl
DTT (0.1 M)	2 µl
Nukleasen-freies Wasser bis	10 µl

**5'-RACE-cDNA Synthese**

Komponente	Volumen
1 µg Gesamt-RNA	x µl
Smart II oligo Primer (10 pmol/µl)	1 µl
5'-CDS Primer (10 pmol/µl)	1 µl
DTT (0.1 M)	2 µl
Nukleasen-freies Wasser bis	10 µl

Danach wurden zu beiden Ansätzen folgende Komponenten zupipettiert:

Komponente	Volumen
5 x PrimeScript™ Puffer	4 µl
10 mM dNTP Mix	1 µl
PrimeScript™ Reverse Transcriptase	0,5 µl
Nukleasen-freies Wasser bis	20 µl

Die Ansätze wurden bei 42 °C 60 min, dann bei 70 °C 15 min inkubiert.

Die gewonnenen cDNAs wurden für die PCR eingesetzt, um die full-length cDNA oder den ORF zu isolieren, oder aber für weitere Untersuchungen bei - 20°C gelagert.

**3.1.8 Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction; PCR)**

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) (Mullis, 1987) ist eine *in vitro*-Technik und ermöglicht die Amplifikation sehr geringer Nucleinsäuremengen einer bestimmten DNA-Sequenz, die zwischen zwei Regionen mit einer bekannten Nucleotidsequenz liegt. Sie stellt eine enzymatische Methode dar, welche auf der Anwendung einer thermostabilen DNA-Polymerase, die aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus* (Taq-Polymerase) gewonnen wird, basiert. Die Größe des amplifizierten Fragments wird durch zwei spezifische Primer bestimmt. Die Basenabfolge der beiden Primer muss komplementär zu der zu amplifizierenden DNA-Sequenz sein.

Standardreaktionsansatz für eine PCR (25 µL)

Ein Reaktionsansatz für die PCR besteht grundsätzlich aus folgenden Komponenten:

Komponente	Volumen
cDNA	1 µl
Primer Forward (Sense) (10 µM)	1 µl
Primer Reverse (Anti-sense) (10 µM)	1 µl
10x Reaktionspuffer, komplettiert mit MgCl <sub>2</sub>	2,5 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
Polymerase (5 U/µl)	0,25 µl
bidest. Wasser ad	25 µl

Die Amplifizierung des gewünschten DNA-Abschnitts erfolgte in drei Schritten:

- **Denaturierung:** Die DNA wird bei 94 °C 15 - 30 s in zwei Einzelstränge getrennt.
- **Annealing:** Je nach Schmelztemperatur der Primer wird die Temperatur auf 40 - 65 °C für 40 s gesenkt (die Temperatur lag in der Regel 5 °C unter dem Schmelzpunkt der angewandten Primer). Die Schmelztemperatur TS von Oligonukleotiden lässt sich wie folgt berechnen:

$$TS = 2\text{ °C} \times (NA + NT) + 4\text{ °C} \times (NC + NG)$$

A, C, G und T bezeichnen die Nukleotide.

Die Formel ist allerdings nur für kurze Primer mit einer Länge um 20 Basen verwendbar. Die Schmelztemperatur hängt nicht nur von der Basenzusammensetzung, sondern auch von der Sequenz ab. Die genaue Temperatur wurde von der Fa. MWG ermittelt.

Die Anlagerungstemperaturen der Primer wurden 5 °C unterhalb ihrer Schmelztemperaturen gewählt.

- **Extension:** Bei 72 °C bzw. 68 °C wird der komplementäre DNA-Strang durch Verlängerung des Primers hergestellt. Allgemein gilt, dass für 1000 bp eine Elongationszeit von einer Minute ausreicht.

Der Zyklus wurde 25 - 30 x durchlaufen. Bei Verwendung der *Taq*-Polymerase erfolgte eine finale Extension für 10 min bei 72 °C.

Standardmäßig wurde die Hot-Start PCR durchgeführt, d.h. die *Taq*-Polymerase wurde nach einer anfänglichen zweiminütigen Denaturierung der Matrize zu dem Reaktionsansatz zugegeben. Diese Vorgehensweise gewährleistet eine möglichst hohe Spezifität der Reaktion. Die Denaturierung erzwingt eine Aufspaltung der doppelsträngigen Matrizen-DNA in DNA Einzelstränge.

Ein Standardtemperaturprogramm für die PCR mit *Taq*-Polymerase ist wie folgt.

Standard-PCR-Programm

Schritt-Nr.	Temperatur (°C)	Zeit (sec)	Zyklus	Bezeichnung
1	94	120	1x	Start-Denaturierung
2	70	0		Pause
3	94	30	25-30x	Denaturierung
4	(TS - 5°C)	40		Annealing
5	72	90		Elongation
6	72	600	1x	Finale Elongation
7	15	0		Pause

Bei Verwendung von *Pfu*-Polymerase wurde die Elongation bei 68 °C für 4 min und die terminale Elongation für 20 min durchgeführt. *Pfu*-PCR-Reaktionen wurden nach folgendem Ansatz durchgeführt:

*Pfu*-PCR-Reaktion

Komponente	Volumen
cDNA	1 µl
Forward-Primer	2 µl
Reverse-Primer	2 µl
dNTP-Mix	2 µl
Buffer+MgSO4	5 µl
<i>Pfu</i> -Polymerase	0,5 µl
bidest. Wasser ad	50 µl

In der hier vorliegenden Arbeit wurden die thermostabilen DNA-Polymerasen *Taq* (*Thermus aquaticus*) und *Pfu* (*Pyrococcus furiosus*) in Kombination mit verschiedenen PCR-Varianten verwendet. Die wichtigsten sind hier genannt.

*Pfu*-PCR-Programm

Schritt-Nr.	Temperatur (°C)	Zeit (sec)	Zyklus	Bezeichnung
1	95	120	1x	Start-Denaturierung
2	70	0		Pause
3	95	30	30x	Denaturierung
4	(TS - 5°C)	40		Annealing
5	68	240		Elongation
6	68	1200	1x	Finale Elongation
7	15	0		Pause

Für eine möglichst hohe und spezifische Ausbeute wurden die PCR-Bedingungen variiert und für jede Matrize und jedes Primerpaar optimiert.

3.1.8.1 Touch-down-PCR

Falls sich die Schmelztemperaturen eines Primerpaares unterschieden oder nicht genau errechenbar waren, wurden manche DNA-Abschnitte im sog. Touch-down-PCR-Programm gewonnen. Hier wurde in den ersten 10 Zyklen die Annealing-Temperatur jeweils um 0,5 bzw. 1 °C gesenkt. Anschließend wurden bei der zuletzt erreichten Temperatur 20 Zyklen einprogrammiert. Die folgende Tabelle stellt das Thermocycler-Programm einer Touch-down-PCR dar.

Standard Touch-Down-PCR Programm

Schritt-Nr.	Temperatur (°C)	Zeit (sec)	Zyklus	Bezeichnung
1	95	120	1x	Start-Denaturierung
2	70	0		Pause
3	94	30	9x	Denaturierung
4	60-50	40		Annealing
5	72	90		Elongation
6	94	30	19x	Denaturierung
7	50	40		Annealing
8	72	90		Elongation
9	72	600	1x	Finale Elongation
10	15	0		Pause

3.1.8.2 Nested PCR

Mit der geschachtelten (nested) PCR können amplifizierte DNA-Fragmente genauer charakterisiert werden. Das Verfahren besteht aus zwei aufeinanderfolgenden PCR. Dabei dient das Produkt der ersten PCR als Matrize für die zweite Amplifikation. Sollte es bei der ersten PCR zur Amplifikation einer unspezifischen Sequenz gekommen sein, liefert die zweite PCR kein Produkt mehr, da die Primer nicht zu der Vorlage komplementär sind.

3.1.8.3 RACE –PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends)

Die RACE-Technik stellt eine PCR-Methode zur Identifizierung unbekannter 3´- und 5´-Regionen von cDNA-Fragmenten dar (Frohman et al., 1988). Das Verfahren beruht auf einer Verknüpfung der cDNA-Enden mit einem Ankerprimer, welcher während der cDNA-Synthese eingeführt wird. Diese artifiziellen Enden können während der PCR mit RACE Primern

und einem genspezifischen Primer zur Aufklärung des offenen Leserahmens (ORF) genutzt werden. Diese Art der PCR wurde unter Standardbedingungen durchgeführt. In einer ersten Amplifikation wurde die Reaktion mit einem genspezifischen Primer und dem RACE-Long Primer durchgeführt. In einer zweiten Amplifikation wurde das Produkt der ersten Reaktion

als Matrize eingesetzt. Hierbei wurde der RACE-Short Primer und ein weiterer, ebenfalls innerhalb der bereits amplifizierte Sequenz gelegener, genspezifischer Primer verwendet. Durch dieses auch Nested-PCR genannte Verfahren lässt sich die Spezifität der Methode deutlich erhöhen.

**3.1.8.4 Semi-Nested PCR mit TATA-Box Primer**

Um die 5`Region eines Gens zu identifizieren kann eine Semi-Nested PCR mit genomischer DNA durchgeführt werden. Dabei wird ein degenerierter Sense-Primer eingesetzt, der an der TATA- Box hybridisiert (Guo et al., 2010). Als Antisense-Primer dienen drei nacheinander gelegene genspezifische Primer, wobei der am weitesten am 3` Ende gelegene Primer für die erste, der nächste für die zweite und der dritte für die letzte PCR verwendet wird. Die TATA- Box liegt in der Promotorregion eukaryotischer Gene ungefähr 25 Basenpaare stromaufwärts des Transkriptionsstarts.

**TATA-Box PCR**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>
DNA (1 µg)	5 µl
TD Primer (50 pmol )	1 µl
Reverse-Primer GSP (10 pmol )	1 µl
10x Reaktionspuffer mit 20 mM MgCl <sub>2</sub>	2,5 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl
bidest. Wasser ad	25 µl

TATA-Box Program

	Schritt-Nr.	Temperatur (°C)	Zeit (sec)	Zyklus
Erst-Amplifikation	1	98	180	
	2	70	Pause	
	3	95	30	
	4	62	30	
	5	72	150	5x ab Schritt 3
	6	95	30	
	7	30	40	
	8	72	150	
	9	95	30	
	10	58	30	
	11	72	150	4x ab Schritt 9
	12	95	30	
	13	56	30	
	14	72	150	9x ab Schritt 12
	15	72	300	
	16	15	Pause	
Zweite und dritte Amplifikation	1	98	180	
	2	70	Pause	
	3	95	30	
	4	65	30	
	5	72	150	3x ab Schritt 3
	6	95	30	
	7	62	30	
	8	72	150	3x ab Schritt 6
	9	95	30	
	10	59	30	
	11	72	150	3x ab Schritt 9
	12	95	30	
	13	56	30	
	14	72	150	15x ab Schritt 12
	15	72	300	
	16	15	Pause	

3.1.8.5 Mutations-PCR

Bei der Mutations-PCR werden die Primer gegenläufig an die komplementären DNA-Stränge spezifisch gebunden. Als Matrize (Template) dient hierbei der Vektor (pRsetB-Vektor), in den die cDNA des Enzyms vorher hinein kloniert wurde. Bei Mehrfachmutationen dient oftmals bereits veränderte DNA aus vorangegangenen Mutations-PCRs als Matrize. Liegen die zu mutierenden Positionen in der DNA nebeneinander, kann ein zweifach verändertes Mutationsprimerpaar für eine Mutations-PCR verwendet werden. Die DNA-Polymerase, in diesem Fall die *Pfu-Polymerase*, fügt

Nucleotide an der 3'OH-Gruppe von Primern an und synthetisiert komplementäre DNA-Sequenzen.

Zur Kontrolle einer erfolgreichen Mutations-PCR wird das PCR-Produkt nach Verdau der Ausgangsmatrix mit *Dpn I* zunächst in kompetente *E. coli* DH5α-Bakterienzellen transformiert.

Nach Anreicherung der Bakterienzellen mit dem implementierten Plasmid wird dieses isoliert und der Bereich, in dem die zu mutierende Stelle liegt, sequenziert.

**Mutations-PCR-Ansatz**

Komponente	Volumen
DNA Plasmid 0,1-1 µg	1 µl
Sense-Mutationsprimer (10 mM)	2 µl
Antisense-Mutationsprimer (10 mM)	2 µl
dNTP mix	2 µl
10 x <i>Pfu</i> Puffer + MgSO4	5 µl
<i>Pfu</i> -Polymerase 3 U/µl	0,5 µl
bidest. Wasser ad	50 µl

**Mutation-PCR Programm**

Schritt-Nr.	Temperatur (°C)	Zeit (sec)	Zyklus
1	95	120	1x
2	70	0	
3	95	30	30x
4	(TS - 5°C)	40	
5	68	240	
6	68	1200	1x
7	15	0	

**3.1.9 Agarose- Gelelektrophorese**

Um DNA-Fragmente aufzutrennen, bedient man sich der Elektrophorese in Agarosegelen. Zwischen dem Logarithmus der Länge eines Fragments und der relativen Wanderungsstrecke besteht eine lineare Abhängigkeit.

Je nach der zu erwartenden Größe der aufzutrennenden Fragmente variiert die Agarosekonzentration zwischen 1 und 2 %. Zunächst wird die Agarose in TAE-Puffer gegeben und so lange aufgekocht, bis sie sich gelöst hat. Anschließend wird sie bis auf 50 – 60 °C abgekühlt.

Der Lösung wird Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5 µg/ml) beigemischt und in eine Elektrophorese-Kammer mit einem Taschenformer in Form eines Kamms gegossen. Nach



Erstarrung wird der Kamm entfernt und in die Taschen ein Gemisch aus 2 µl 6x Ladepuffer (zur Abschätzung der Lauflänge) sowie 20 µl DNA-Lösung einpipettiert. Durch Verwendung eines aus DNA-Fragmenten bestehenden Kalibrierstandards bekannter Größen (DNA-Ladder) können die Längen der DNA-Fragmente bestimmt werden. Die DNA wird in TAE-Puffer bei 120 V (die Spannung ist gelabhängig) elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt.

Durch Interkalation von Ethidiumbromid in der DNA kann sie im UV-Licht bei 260 nm detektiert werden.

#### **3.1.9.1 Isolierung von DNA aus Agarosegelen**

Durch Gelelektrophorese aufgetrennte DNA-Fragmente mussten aus der Matrix extrahiert werden. Dazu wurden unter UV-Licht die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA wurde mit Hilfe des innuPREPDOUBLEpure Kits (analytikjena Biometra) zurück gewonnen. Das Verfahren beruht auf der Schmelze des Gels in Extraktionspuffer, Adsorption der DNA an einer Kieselgelmatrix und abschließenden Wasch- und Elutionsschritten.

Die so extrahierte DNA kann direkt für weitere Arbeitsschritte eingesetzt oder bei -20 °C gelagert werden.

#### **3.1.10 Herstellung eines T-Überhangvektors**

Der dT-Überhang wird an ein glattes (blunt-end) Ende einer DNA Sequenz addiert (Holton und Graham, 1990). Zur Herstellung eines T-Überhangvektors wurden ca. 10 µg des Vektors p-GEM easy T mit dem Restriktionsenzym *EcoRV* für 12 - 16 h bei 37 °C inkubiert.

Die geschnittene DNA wurde gefällt und in 85 µl bidest. Wasser aufgenommen. Anschließend wurden 10 µl Taq-Polymerase-Puffer, 2 µl dTT (100 µM) und 6 Units *Taq*-Polymerase zugegeben. Dieser Ansatz wurde für zwei Stunden bei 70 °C inkubiert. Das Syntheseprodukt wurde über eine innuPREPDOUBLEpure Säule (Analytikjena Biometra) aufgereinigt und die DNA Konzentration bestimmt. Falls nötig, wurde die DNA mit TE-Puffer auf eine Konzentration von 50 ng/µl verdünnt.

#### **3.1.11 Restriktion mittels Typ-II-Endonukleasen**

Die in die Gruppe II der Restriktionsendonukleasen eingeteilten Enzyme hydrolysieren die Phosphodiesterbindung der DNA meist innerhalb einer palindromischen Erkennungssequenz.

Die zu schneidende DNA, der optimale Puffer (laut Herstellerangaben) und die entsprechende Endonuklease wurden gemischt und beim Temperaturoptimum 2-4 h inkubiert. Falls die DNA mit mehreren Restriktionsenzymen zu schneiden war, wurde der Puffer gewählt, in dem beide Enzyme eine ausreichende Aktivität aufwiesen.

Der Reaktionsansatz bestand aus ca. 500 ng DNA, 2 µl 10x Puffer, Restriktionsenzym und bidest. Wasser ad 20 µl.

Restriktionsenzyme lassen sich in drei Klassen einteilen. Typ I und Typ III klassifizierte Enzyme sind ATP-abhängig, besitzen Endonuklease- und Methylaseaktivität und schneiden DNA in unterschiedlicher Entfernung zur Erkennungssequenz. Es entstehen DNA Fragmente definierter Länge mit variablen Enden. Die hier verwendeten Typ II Endonukleasen sind nicht ATP-abhängige Enzyme, die Phosphodiesterbindungen der DNA an meist palindromischen Erkennungssequenzen hydrolysieren. Für den Restriktionsverdau wurde das entsprechende Enzym nach Angaben des Herstellers mit Puffer und DNA versetzt und für 60 min inkubiert. Falls die DNA mit zwei Restriktionsenzymen zu schneiden war, wurde der Puffer gewählt, in dem beide Enzyme eine ausreichende Aktivität aufwiesen.

#### **Standard-Restriktionsansatz**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>
DNA (50-200 ng/µl)	3 µl
Endonuklease	0,5 µl
10x Reaktionspuffer	2 µl
dH <sub>2</sub> O ad.	20 µl

Beispiel Restriktionsverdau: *EcoR* I

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>
Plasmid-DNA	3 µl
<i>EcoR</i> I	0,5 µl
Puffer	2 µl
dH <sub>2</sub> O ad.	20 µl

Dann bei 37 °C für 1 h inkubiert.

Beispiel für einen Doppel-Restriktions-Verdau: *Kpn* I / *Nhe* I

Komponente	Volumen
pRSET B, ORF cDNA oder Plasmid-DNA	3 µl
<i>Kpn</i> I (10 u/µl)	2 µl
<i>Nhe</i> I (10 u/µl)	0,5 µl
10 x Buffer Tango <sup>TM</sup> ( Fermentas)	2 µl
dH <sub>2</sub> O ad.	20 µl

Dann bei 37°C für 3 h inkubiert.

### 3.1.12 Ligation mittels T4-DNA-Ligase

Bei einer Ligation wird die Phosphodiesterbindung zwischen einer 5'-Phosphatgruppe an einem DNA-Ende und der 3'-OH-Gruppe an dem anderen DNA-Ende geschlossen.

Für die Ligation mit einem T-Überhangvektor wird das gereinigte, mit *Taq*-DNA-Polymerase gewonnene PCR-Amplifikat eingesetzt. Die *Taq*-Polymerase hängt unspezifisch an das 3'-Ende von PCR-Produkten einzelne Basen an, meistens ein Desoxyadenosin (dA). PCR-Amplifikate, die mit der *Taq*-Polymerase synthetisiert wurden, können so ohne vorausgehenden Restriktionsverdau in einen entsprechenden T-Überhangvektor ligiert werden. Die Ligation mit verschiedenen Vektoren erfolgte laut Herstellerangaben.

Für andere Ligationen wurden die Enden der DNA-Fragmente durch Restriktionsenzyme verdaut, so dass klebrige oder glatte Enden entstanden. Das Insert wurde im Überschuss mit entsprechendem Plasmid, Ligationspuffer und der T4-DNA-Ligase entweder 2 h bei Raumtemperatur oder 12-16 h bei 4 °C inkubiert. Das molare Verhältnis Insert : Vektor betrug dabei zwischen 3:1 und 10:1. Es wurden die ligierten Plamid-DNAs für die Transformation von DH5α verwendet.

### Ligationsansatz mittels T4-DNA-Ligase

Komponente	Volumen
Vektor-DNA (50 ng/µl)	1 µl
Insert-DNA	5 µl
10x Reaktionspuffer	1 µl
T4-DNA-Ligase (5 units/µl)	0,5 µl
dH <sub>2</sub> O ad	10 µl

### 3.1.13 Reinigung von PCR-Produkten

Die Reinigung von PCR Produkten oder Ligationsansätzen diente lediglich dem Entfernen von dNTPs und Salzen, welche beispielsweise einen störenden Einfluss auf

Sequenzierungsreaktionen haben. Die Durchführung erfolgte auch hier gemäß des innuPREPpure PCR Purification Kit Protokolls (Analytikjena Biometra).

#### **3.1.14 Klonierung in das pGEM-T Easy Vektor System**

Aus der PCR gewonnene DNA-Amplifikate können bei Verwendung von *Taq*-Polymerase direkt in einen T-Überhangvektor kloniert werden. Dabei macht man sich die Eigenschaft der Polymerase zunutze, die DNA-Synthese stets mit einem Überhang eines Desoxyadenosins abzuschließen. Dieser Überhang dient zur Klonierung in den komplementären Desoxythymidin-Überhangvektor, wobei die Insertionsrichtung nicht vorgegeben ist. Der pGEM-T Easy Vektor stellt ein high-copy Plasmid dar, welches benachbart zur Multiple-Cloning-Site (MCS) T7- und SP6-RNA-Polymerasepromotoren besitzt. Die MCS ist ihrerseits in die *lacZ*-Kassette integriert, so dass erfolgreich eingefügte Inserts auf entsprechendem Medium mit X-Gal und IPTG durch Blau-Weis-Selektion identifiziert werden können. Der Vektor trägt ein Ampicillin-Resistenzgen. Mit pGEM-T Easy erstellte Vektorkonstrukte wurden für die Fragmentanalyse mittels Restriktionsverdau oder Sequenzierung verwendet.

#### **3.1.15 Klonierung in das pRSET B Vektor System**

Wurden offene Leserahmen für die heterologe Expression von Proteinen in das pRSET-B Vektor-System ligiert, so wurden bereits die PCR-Primer mit den benötigten Restriktionsschnittstellen versehen. Daraus gewonnene DNA-Amplifikate und der Expressionsvektor wurden mit den entsprechenden Endonukleasen verdaut und der daraus resultierende komplementäre Überhang mittels T4-DNA-Ligase verknüpft. Durch den Einsatz von zwei verschiedenen Restriktionsschnittstellen innerhalb der MCS war eine gerichtete Insertion möglich, so dass eine dem Leseraster folgende Transkription gewährleistet werden könnte. Der pRSET-B Vektor verfügt zwischen dem T7-Promotor und der MSC über einen Bereich, der für Polyhistidin (6x His) kodiert. Dieser wird bei der Expression N-terminal an das rekombinante Protein angefügt und dient der späteren Aufreinigung. Der pRSET-B Plasmidvektor trägt ebenfalls ein Ampicillin-Resistenzgen.

#### **3.1.16 CaCl<sub>2</sub>-vermittelte Transformation von *E. coli***

##### **3.1.16.1 Herstellung kompetenter *E. coli***

Die beschriebenen Bakterienstämme (2.7.1) wurden nach der Calciumchlorid-Methode für die Transformation kompetent gemacht (Mandel und Higa 1970; Cohen et al., 1972; Dagert und Erlich, 1979). Von einer ausplattierten Dauerkultur wurde eine Kolonie über Nacht in 5

ml LB-Medium angezogen und von dieser 1 ml in 50 ml frisches Medium überführt. Bei einer Konzentration von OD<sub>600</sub> 0,6-0,8 wurden die Bakterien in einem Falcon-Röhrchen bei 3000 rpm und 4 °C abzentrifugiert und mit 50 ml einer eiskalten 0,05 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung gewaschen. Es wurde erneut zentrifugiert, das Pellet in 20 ml der CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und die Lösung weitere 20 min auf Eis gehalten. Es wurde wieder zentrifugiert und das Pellet in 940 µl 0,05 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung aufgenommen. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurden der Lösung 140 µl Glycerin hinzugesetzt, die Mischung in 50 µl-Aliquote aufgeteilt und diese bei -80 °C bis zur Transformation gelagert.

#### **3.1.16.2 Transformation von *E. coli* DH5α**

Für den Transfer von Vektorkonstrukten in kompetente Zellen wurden *E. coli*-Stämme verwendet. Pro Ansatz wurden 50 µl CaCl<sub>2</sub>-kompetente *E. coli*-Zellen vom Stamm DH5α mit 5 µl Plasmid-DNA aus der Ligation gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz 45 s bei 42 °C (Hitzeschock) behandelt und dann sofort 5 min auf Eis abgekühlt. Zur Regeneration wurden 900 µl SOC-Medium oder 700 µl LB-Medium zu den Zellen zugegeben und 1 h bei 37 °C auf einem Inkubationsschüttler inkubiert.

Danach wurde der Ansatz für 5 min bei 5000 rpm abzentrifugiert und das Zellpellet in ca. 500 µl SOC-Medium oder LB-Medium aufgenommen und auf einer LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Erfolgreich transformierte Bakterien konnten nach Inkubation über Nacht (37 °C) detektiert werden.

#### **3.1.16.3 Transformation von *E. coli* in BL21(DE3)pLysS**

Der Transfer von Plasmid-DNA in BL21(DE3)pLysS wurde analog mit dem Hitzeschockverfahren durchgeführt. Der BL21(DE3)pLysS *E. coli*-Stamm wurde für die heterologe Expression rekombinanter und mutierter Proteine eingesetzt. BL21(DE3)pLysS zeichnet sich durch eine zusätzliche Expression von T7 Lysozym aus. T7 Lysozym führt erstens zu einer Unterdrückung der basalen Expression des rekombinanten Proteins und zweitens zur Spaltung von Peptidoglycanbindungen in der Bakterienzellwand, wodurch die spätere Ultraschall-Lyse der Bakterien erleichtert wird. BL21(DE3)pLysS trägt für erweiterte Selektionsmöglichkeiten eine Chloramphenicol-Resistenz. Pro Ansatz wurden 50 µl CaCl<sub>2</sub>-kompetente *E. coli*-Zellen vom Stamm BL21 mit 1 µl (pRSET B - ORFcDNA) Plasmid-DNA aus der Ligation gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz 20 s bei 42 °C (Hitzeschock) behandelt und dann sofort 5 min auf Eis abgekühlt. Zur Regeneration wurden 700 µl SOC-Medium zu den Zellen zugegeben

und 1 h bei 37 °C auf einem Inkubationsschüttler inkubiert. Danach wurde der Ansatz für 5 min bei 5000 rpm abzentrifugiert, das Zellpellet in ca. 80 µl SOC-Medium aufgenommen und auf einer LB-Agarplatte mit 20 µl Ampicillin (100 mg/ml) und 30 - 50 µl Chloramphenicol (35 mg/ml) ausplattiert. Erfolgreich transformierte Bakterien konnten nach Inkubation über Nacht (37 °C) detektiert werden.

#### **3.1.16.4 Insertionskontrolle**

Die Insertionskontrolle von Plasmiden dient der Überprüfung auf erfolgreiche Ligation und Transformation. Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Vektoren enthielten alle wenigstens ein Antibiotikumresistenz-Gen. Durch Zugabe des entsprechenden Antibiotikums (oder mehrerer Antibiotika) zum Anzuchtmedium wurde die erste Selektion auf transformierte und nicht transformierte *E. coli* durchgeführt. Transformierte kompetente *E. coli*-Zellen können sich so auf Selektionsmedium vermehren. Bei Transformationen mit Vektoren, die das lacZ'-Gen zur  $\alpha$ -Komplementation der  $\beta$ -Galaktosidase enthielten, wurde eine Blau-Weiß-Selektion zur Detektion rekombinanter Plasmide durchgeführt. Die Agarplatten mit Antibiotikum wurden mit 25 µl 0,5 M IPTG Lösung und 25 µl X-Gal Lösung überschichtet. Der Zellenüberstand wurde anschließend ausplattiert. Bakterienkolonien, in denen durch Insertion die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase nicht möglich ist, können nicht das Substrat X-Gal enzymatisch umsetzen und bilden weiße Kolonien. Die erfolgreiche Ligation des Zielfragments wurde nach Isolierung von Plasmid-DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen überprüft. Dafür wurden jeweils das Insert flankierende Schnittstellen des Vektors verwendet und die Größe der Restriktionsfragmente mittels Elektrophorese überprüft.

#### **3.1.17 Plasmidisolation aus *E. coli* mit Minipräparation**

Plasmid-DNA wurde in *E. coli*-Zellen vom Stamm DH5 $\alpha$  über Nacht bei 37 °C in einem Schüttler vermehrt. Für die Isolierung von Plasmiden aus den verwendeten *E. coli*-Stämmen wurde die Methode der alkalischen Lyse (Birnboim und Dolly, 1979) benutzt. Zur Durchführung der Methode wurden 3 ml der Übernachtskultur bei 5000 rpm 5 min zentrifugiert und das Bakterienpellet in 300 µl Puffer 1 resuspendiert. Durch Zugabe von 300 µl Puffer 2 wurde die alkalische Lyse mit SDS eingeleitet. RNase A baute störende RNA während der 5 min-Inkubation bei Raumtemperatur ab. Durch Zugabe von 300 µl Puffer 3 wurden zelluläre Bestandteile und Proteine während einer Inkubation für 20 min auf Eis gefällt. Nach 10 min Zentrifugation bei 13000 rpm wurde der klare Überstand (800 µl) in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der abzentrifugierte Überstand wurde mit 1 Volumenanteil Chloroform (800 µl) extrahiert und die Plasmid-DNA (600 µl) mit 2/3

Volumenanteil Isopropanol (ca. 420 µl) aus der wässrigen Phase präzipitiert. Das nach 30 min Zentrifugation sedimentierte Pellet wurde in 70% Ethanol (500 µl) gewaschen, anschließend bei 37 °C getrocknet und in 40 µl TE-Puffer oder dH<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Plasmid-DNA-Lösung wurde bei -20 °C für spätere Untersuchungen gelagert oder direkt mit Restriktions-Enzym verdaut. Die Plasmid-DNA Konzentration wurde bestimmt. Die Ausbeuten dieses Verfahrens lagen bei 100 - 500 ng/µl.

### 3.1.18 DNA-Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurde das automatische Sequenzier-System von Applied Biosystems (Modell 377) verwendet. Das Verfahren beruht auf der Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977). Dabei wird zunächst eine PCR mit genspezifischen Primern und Plasmid-DNA als Matrize durchgeführt. Zusätzlich zu dNTPs werden dem Reaktionsansatz Didesoxynukleotide (ddNTPs) zugesetzt. Aufgrund der fehlenden Verknüpfungsstelle in 3'-Position der Didesoxyribose kommt es bei Einbau eines ddNTP während der Elongation zum Kettenabbruch. Es werden so während der PCR alle denkbaren Längen der Matrizen-DNA bis zum jeweiligen Abbruch synthetisiert. Die ddNTPs tragen für jedes der vier möglichen Nukleotide jeweils individuelle Fluoreszenzfarbstoffe. Die so entstandenen, unterschiedlich langen ssDNA-Fragmente werden auf einer Polyacrylamidmatrix elektrophoretisch getrennt und das terminale, fluoreszenzmarkierte Nukleotid mittels Laserlichtanregung detektiert.

#### 3.1.18.1 Probenaufbereitung

Die PCR wurde mit dem BigDyeR Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) durchgeführt. Das Kit enthält sämtliche Lösungen für den Premix und die *Taq*-Polymerase. Als Template diente 1 µg (1000 ng) saubere Plasmid-DNA. Die DNA-Konzentration wurde UV-spektroskopisch bei 260 nm bestimmt. Der verwendete Primer war entweder Vektor- oder Insertspezifisch. Nach Berechnung der Plasmid-cDNA Konzentration (x ng/µl) wurde das Volumen (V<sub>x</sub>), das 1000 ng entsprach, berechnet.

$$\begin{array}{lcl} x \text{ ng} & \longrightarrow & 1 \text{ µl} \\ 1000 \text{ ng} & \longrightarrow & V_x \end{array}$$

$$V_x (\text{µl}) = (1000 \text{ ng} \times 1 \text{ µl}) / x \text{ ng}$$

V<sub>x</sub> µl Plasmid-cDNA wurden in ein PCR-Tube pipetiert und getrocknet und anschließend wurde die Sequenzierungs-PCR durchgeführt.

**Sequenzierungsansatz**

Komponente	Volumen
Plasmid-DNA (1 µg) oder PCR Produkt (30 ng)	Vx µl
ABI - Premix	0,75 µl
Puffer	1,25 µl
Primer (10 pmol/µl)	1 µl
dH2O	ad 10 µl

**Thermocycler-Programm**

Schritt-Nr.	Temperatur (°C)	Zeit (sec)	Zyklus	Bezeichnung
1	96	60	1x	Denaturierung
2	96	30		Denaturierung
3	50	15	25x	Annealing
4	60	240		Elongation
5	15	0		Pause

Die Kettenabbruchfragmente wurden nach der PCR durch Ethanolfällung (250 µl) aus einer 3 M (pH 5,2 bzw. 4,7) Natriumacetatlösung mit 1 µl Glycogen-Lösung (20 µg/µl) von den übrigen Reaktionskomponenten (überschüssige Primer, nicht eingebaute Nukleotide und Dye- Terminatoren) getrennt. Die durch Zentrifugation sedimentierte DNA wurde mit Ethanol (70%) gewaschen und bei 37 °C getrocknet. Vor dem Auftragen auf das Polyacrylamidgel wurde die DNA in 2 µl Ladepuffer aufgenommen und für 5 min bei 95 °C denaturiert und sofort auf Eis gekühlt.

**3.1.18.2 Sequenziergel**

Die Schichtdicke des Polyacrylamidgels betrug 0,2 mm und bestand aus folgenden Komponenten.

**Zusammensetzung von Polyacrylamidgelen zur DNA-Sequenzierung**

Komponente	Masse oder Volumen
Harnstoff	9 g
10x TBE-Puffer	3 ml
ddH <sub>2</sub> O	11,5 ml
Acrylamid/Bis. 30%	3,75 ml
TEMED	10 µl
10% (w/v) APS	200 µl

Durch Zugabe von APS und TEMED wurde die Polymerisation gestartet. Nach 90 min wurde



das Gel mit Produkten der Sequenzierreaktion beladen und im ABI PRISM 377 entwickelt. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte über die Factura<sup>TM</sup>-Software (Perkin Elmer).

### 3.1.18.3 DNA-Sequenzierung bei MWG (mwg-biotech) und GATC

Folgenden Bedingungen wurde gefolgt und anschließend die Plasmid-DNA Proben zur Sequenzierung zu MWG oder GATC geschickt:

#### Sequenzierung bei MWG

<b>Konzentration</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Plasmid-DNA: 50 – 100 ng/μl</li><li>- PCR-Produkt: 2 – 10 ng/μl</li><li>- Kundenprimer: 2 pmol/μl</li></ul>
<b>Volumen</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- DNA und Primer: je 15 μl in separaten Reaktionsgefäßen</li><li>- DNA in Wasser oder in 5 mM Tris-HCl (pH 8,0 – 9,0) gelöst und gesendet.</li><li>- DNA-Proben und Primer in 1,5 ml Reaktionsgefäßen.</li></ul>

#### Sequenzierung bei GATC

<b>Konzentration</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Plasmid-DNA: 30 – 100 ng/μl</li><li>- PCR-Produkt: 10 – 50 ng/μl</li><li>- Kundenprimer: 10 pmol/μl</li></ul>
<b>Volumen</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- DNA und Primer: je 30 μl in separaten Reaktionsgefäßen</li><li>- DNA in Wasser gelöst und gesendet.</li><li>- Die Lösung darf kein EDTA enthalten.</li><li>- DNA-Proben und Primer in 1,5 ml Reaktionsgefäßen.</li></ul>

### 3.1.18.4 Auswertung der Sequenzierdaten

Die erhaltenen Sequenzen und daraus abgeleitete Aminosäuresequenzen wurden mittels der Software Lasergene 99 DNA STAR bearbeitet. Lasergene 99 DNA STAR enthält 6 Programme für die Auswertung und Analyse von DNA- und Protein-Sequenzen und bietet Software-Lösungen für vielfältige molekularbiologische Fragestellungen wie SNP Discovery, automatische virtuelle Klonierung, BLAST und Entrez Textsuche, Gene Discovery, Multiple- Sequence-Alignment , Primer-Design oder Oligonucleotid-Design, Proteinstrukturvorhersagen und Sequenzassemblierung.

Für initiale Ähnlichkeitssuchen oder Datenbankvergleiche mit bekannten DNA- und Aminosäuresequenzen wurden die Großdatenbanken des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA) mit der enthaltenen BLAST Suchoption (Altschul et al., 1997) benutzt.

### 3.1.19 Heterologe Expression

Zur Herstellung größerer Mengen an rekombinantem Protein wurde das jeweilige Genkonstrukt unter Berücksichtigung des Leserasters in den Vektore pRSET-B kloniert.

Das Konstrukt wurde in *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformiert und auf LB-Platten mit Ampicillin (100 µg/ml) und Chloramphenicol (60 µg/ml) zur Selektion ausplattiert. Ein Klon wird über Nacht in einer Lösung von 10 ml LB-Medium, Ampicillin und Chloramphenicol aufgezogen. Davon werden 4 ml zum Animpfen in eine 100 ml LB-Lösung gegeben und bis zu einem Trübungsgrad OD<sub>600</sub> von 0,6 – 0,8 bei 37 °C inkubiert. Die Induktion der Fusionsprotein-Expression erfolgte durch Zugabe von 200 µl steriler IPTG-Lösung (1 mM). Dann folgten weitere 4-16 h Inkubation bei 25 °C. Danach wurde die Kultur 5 min bei 5000 rpm abzentrifugiert.

**3.1.19.1 Zellaufschluss**

Das Bakterienpellet aus 100 ml Medium wurde in 3 ml Lysispuffer mit 20 mM Imidazol pH 8 aufgenommen und am Sonifier durch Ultraschall auf Eis aufgeschlossen. Diese Lösung wurde bei 4°C 20 Minuten bei 13000 rpm scharf abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde für die Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie verwendet.

**3.1.20 *in situ*-Hybridisierung**

**3.1.20.1 Synthese von DIG-markierten RNS-Sonden (*in vitro*-Transkription)**

Die Synthese der Digoxigenin (DIG)-markierten RNS-Sonden wurde unter Verwendung des „*mir*Vana Probe Construction Kit“ vorbereitet. Hierbei synthetisiert die T7-RNAase-Polymerase in Gegenwart von markierten Nukleotiden (hier: DIG-11-UTP) einzelsträngige RNS-Sonden (Ribosonden, “riboprobes“) (Abb. 2.6).

❖ Hybridisieren von Oligonukleotid-Vorlage und T7 Promotor Primer:

Reagenzien	Menge
T7 Promotor Primer	2 µl
DNA Hybridisierung Puffer	6 µl
Oligonukleotid Template (100 µM)	2 µl
5 Minuten bei 70°C inkubieren, dann 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.	
Addieren der folgenden Reagenzien auf die hybridisierten Oligonukleotide:	
10x Klenow Reaktion Puffer	2 µl
10x dNTP Mix	2 µl
dH <sub>2</sub> O	4 µl
Exo-Klenow	2 µl
Gut mischen und kurz abzentrifugieren, dann 30 Minuten bei 37°C auf einem Wärmeblock inkubieren.	

Die hybridisierten Oligonukleotide werden in der Transkriptionsreaktion verwendet.

❖ Ansatz für die Synthese von DIG-markierten RNS-Sonden

Reagenzien	Menge
dH <sub>2</sub> O	ad. 20 µl
ds DNA Template	1 µl
10x Transkriptionspuffer	2 µl
10 mM ATP	1 µl
10 mM CTP	1 µl
10 mM GTP	1 µl
Markiertes UTP	1 µl
T7 RNA Polymerase	2 µl

30 Minuten bei 37 °C inkubieren.

❖ 1 µl DNase I (zur Entfernung der Template-DNS) zugeben.

❖ 10 Minuten bei 37°C inkubieren.

Die Sonde wurde bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C gelagert.

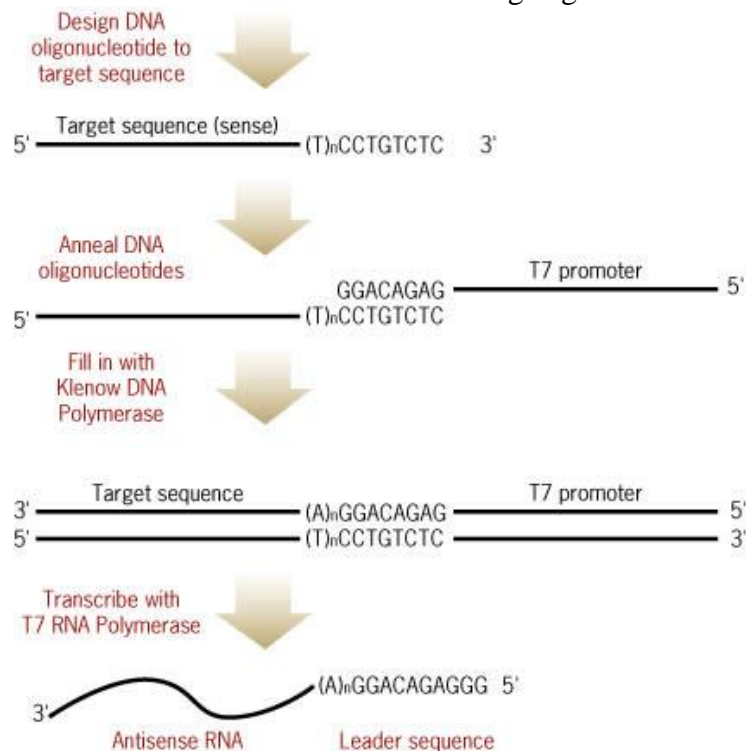


Abb. 2.6: Synthese von markierten RNS-Sonden (*in vitro*-Transkription)

### **3.1.20.2 *in situ*-Hybridisierung (ISH)**

Die Durchführung der ISH zur Lokalisation der mRNA von HpBUS und HpaBPS erfolgte entsprechend dem Protokoll nach Hejtko et al. (2006).

Alle Puffer und Lösungen wurden vor Gebrauch autoklaviert oder im Versuch frisch angesetzt.

#### **a. Durchführung der ISH**

##### **Tag N1:**

1. Fixieren der Hp-Sprosskulturen für 45 Minuten bei RT
2. Waschen der Pflanzenmaterialien in Methanol für 3 x 5 Minuten, danach in 96% Ethanol für 3 x 5 Minuten
3. Konservieren der Pflanzenmaterialien in 96% Ethanol bei -20C

##### **Tag N2:**

1. Waschen der Pflanzenmaterialien mit 1:1 (v/v) Xylen/Ethanol für 30 Minuten
2. Waschen in 96% Ethanol für 2 x 5 Minuten
3. Waschen in 75% Ethanol (in DMPC-Wasser) für 10 Minuten
4. Waschen in 50% Ethanol (in PBS-Puffer) für 10 Minuten
5. Waschen in 25% Ethanol (in PBS-Puffer) für 10 Minuten
6. Fixieren für 20 Minuten bei RT
7. Waschen in PBS-Puffer/0.1% Tween-20 3 x 10 Minuten
8. Proteolytische Vorbehandlung mit 125 g/ml Proteinase K (in DMPC-Wasser) für 15 Minuten bei 37C (die Lösung wurde jeweils im Versuch frisch angesetzt)
9. Abstoppen der Proteinase K durch Inkubation in 2%igem Glycin-PBS für 5 Minuten bei RT
10. Waschen in PBS-Puffer/0.1% Tween-20 2 x 10 Minuten
11. Refixieren für 20 Minuten bei RT
12. Waschen in PBS-Puffer/0.1% Tween-20 2 x 10 Minuten
13. Prähybridisierung der Pflanzenmaterialien für 10 Minuten bei RT, dann für mindestens 60 Minuten bei 55C
14. Hybridisierung der Sonde in komplettem Hybridisierungsmix für 16 Stunden bei 55C. Die Konzentration der eingesetzten Sonde lag durchschnittlich bei 20 – 100 ng/ml Hybridisierungsmix. Jede Sonde wurde vor dem Auftragen 10 Minuten bei 70C gekocht

**Tag N°3:**

1. Posthybridisierungswaschungen unter steigend stringenten Bedingungen mit 50% Formamid in 2x SSC/Tween-20 dreimal für 10 Minuten, 60 Minuten und 30 Minuten bei 55°C und mit 0,2x SSC zweimal für 20 Minuten bei 55°C
2. Waschen in PBS-Puffer/0.1% Tween-20 3 x 10 Minuten bei RT
3. Inkubieren der Proben in BSA-Puffer für 90 Minuten bei RT
4. Auftragen der Anti-DIG-Antikörperslösung in einer Verdünnung von 1:2000 und Inkubation der Pflanzenmaterialien für 16 Stunden im Dunkeln bei RT

**Tag N°4:**

1. Waschen in PBS-Puffer/Tween-20 8 x 20 Minuten
2. Waschen in ALP-Puffer 2 x 10 Minuten
3. Inkubation in der Farblösung, abhängig von der hybridisierten Sonde bis zu 5 Stunden im Dunkeln bei RT
4. Abstoppen der Farbreaktion mit 96% Ethanol für 10 Minuten, dann Konservieren der Proben in 50% Ethanol

**b. Methacrylatschnitte**

Die Herstellung von Methacrylatschnitten wurde wie folgt durchgeführt:

Die Proben wurden in 96% Ethanol : Technovit 7100 (1:1) bei 4°C präinfiltriert. Danach wurden die Pflanzenmaterialien über Nacht in Vorbereitungslösung bei RT infiltriert, schließlich in Vorbereitungslösung : Härter II (15:1) eingebettet und über Nacht bei RT auspolymerisiert. Die Präparate wurden dann mit Technovit 3040 fixiert und bei RT gelagert. Es wurden 10 µm Semidünnschnitte mit einem Mikrotom (HM 355 S, Microme) angefertigt und auf Objektträger transferiert. Abschließend wurden die Proben unter dem Mikroskop (Axiostart, Zeiss) analysiert und mit der Digitalkamera (dhs MicroCam 5.0) fotografiert.

**3.2 Analytische und biochemische Methoden****3.2.1 Affinitätschromatographie**

Die Affinitätschromatographie beruht auf der Interaktion zwischen einer Matrix und dem zu reinigenden Protein. Nach der Zelllyse und der Zentrifugation befinden sich in der Lösung neben dem Zielenzym noch sämtliche aus *E. coli* stammenden löslichen Zellproteine. Da eine spezifische Aktivität des im Interesse stehenden Proteins nur unter Ausschluss von Fremdmolekülen untersucht werden kann, müssen diese von dem Enzym getrennt werden. Das aufzureinigende Enzym besitzt die Eigenschaft, sich an die Matrix zu binden und kann

somit vom Rest des Extraktes getrennt werden. Anschließend muss das Protein von der Matrix mittels eines Elutionspuffers abgelöst werden.

### **3.2.1.1 Reinigung über Bindung an Ni-NTA-Agarose**

In dieser Arbeit wurden sowohl die rekombinanten Wildtyp- als auch die mutierten Proteine mit Ni-NTA-Agarose aufgereinigt.

Rekombinante His-Fusionsproteine wurden nach Aufschluss des Bakterienzellpellets mit Ni-NTA-Agarose (200 µl) inkubiert und über mehrere Waschschriffe von bakteriellen Kontaminationen befreit. Dazu wurden die bei -20°C gelagerten Bakterienzellpellets für 15 min auf Eis aufgetaut, mit Lysis-Puffer resuspendiert (3 ml) und mit Ni-NTA-Agarose für 60 min bei 4°C auf einem Rotator inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde die Lösung über der Fritte einer leeren PD10-Säule von der Gelmatrix abgetrennt. Die Agarose mit dem gebundenen Protein wurde 5x mit 1 ml Waschpuffer (80 mM Imidazol) gewaschen. Die Elution des Zielproteins erfolgte mit 5x 0,5 ml Elutionspuffer (150 mM Imidazol). Zur dauerhaften Lagerung wird umgepuffert, weil Imidazol bei -20 °C auskristallisiert und somit das Protein irreversibel denaturiert.

Die Umpufferung geschieht mit Hilfe der Grössenausschlusschromatographie (PD10-Säulen; Amersham Biosciences). Zunächst werden diese Säulen mit Tris-Puffer (ohne Imidazol) äquilibriert. Anschließend gibt man 2,5 ml Proteinlösung mit Imidazol auf die Säule und eluiert mit 3,5 ml Tris-Puffer pH 6,5-7. Nach Zugabe von 20 % Glycerol zur Stabilitätserhöhung des bei -20 °C zu lagernden Proteins erfolgt eine Bradford-Bestimmung (3.2.2), um die Konzentration des Proteins in der Lösung zu ermitteln.

### **3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Zur Bestimmung des Proteingehalts wurde die schnelle photometrische Bestimmung nach Bradford (1976) verwendet. Grundlage dieser Messung ist eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs Coomassie brilliant blue G-250 bei der Bindung an die Seitenketten von Proteinen. Der ungebundene kationische Trimethylfarbstoff hat ein Absorptionsmaximum von 470 nm, welches sich durch Komplexbildung mit kationischen Seitenketten in saurer Lösung auf 595 nm verschiebt, da der Farbstoff dann in seiner anionischen Sulfonatform stabilisiert wird.

Für die Bestimmung der Konzentration wurden 1-10 µl der Proteinlösung mit der jeweiligen Pufferlösung, in der das Protein vorlag, ad 10 µl versetzt. Nach Zugabe von 900 µl Bradford-Reagenz wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption der

Lösung wurde gegen einen Blindwert, der 100 µl des Puffers und 900 µl Bradford-Reagenz enthielt, bei 595 nm vermessen.

Anhand einer Kalibriergeraden, die zuvor mit BSA im gleichen Konzentrationsbereich (1-20 µg/ml) erstellt wurde, konnte der Proteingehalt berechnet werden.

### **3.2.3 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Mittels dieser Methode lassen sich die Größe bzw. die Untereinheiten-Molekulargewichte von Proteinen bestimmen (Laemmli, 1970).

#### **3.2.3.1 Herstellung des Gels und Probenvorbereitung**

Die Elektrophorese wird in einer Kammer für vertikale Plattengele durchgeführt. Für die Herstellung des Trenngels werden 1,5 M Tris-HCL-Puffer, Reinstwasser und 10 %iges SDS miteinander vermischt. Nach Zugabe von 0,1 ml einer 10 %igen APS-Lösung und 5 µl TEMED wird die Lösung zwischen zwei Glasplatten pipettiert und mit Wasser überschichtet. Bei Raumtemperatur bildete sich ein stabiles Gel. Nach der Verfestigung wird das Wasser entfernt und das frisch hergestellte Sammelgel (0,5 M Tris-HCL-Puffer, 10 % SDS, 10 % APS, TEMED und Reinstwasser) aufgetragen. Anschließend wird der Taschenformer in Form eines Kamms eingesetzt. Nach der Auspolymerisierung wird der Kamm entfernt und in die Taschen die Proteinproben (je 5 µg) pipettiert. Zu den Proben werden vorher 15 µl Probenpuffer (β-Mercaptoethanol-haltig) hinzugemischt und mit Reinstwasser auf 20 µl aufgefüllt. Dieses Gemisch wird für 5 min bei 90 °C erhitzt. Zusätzlich wird in eine Tasche ein Größenmarker (MWG Technologies, Invitrogen) geladen.

#### **3.2.3.2 Elektrophorese und Detektion der Proteinbanden**

Zunächst wird die Elektrophoresekammer mit Laufpuffer gefüllt und Spannung an die Elektroden angelegt. Die Trennung der Proteine erfolgt bei 200 V, 15 W und 75 mA. Nach der Elektrophorese wird zur Detektion das Trenngel für eine Stunde in Coomassie-Lösung gefärbt und anschließend mit Entfärberlösung mehrere Stunden behandelt. Auf diese Weise werden die Proteinbanden sichtbar gemacht.

#### **3.2.3.3 Bestimmung des Molekulargewichts**

Mit Hilfe der Protein-Leiter lässt sich das Gewicht des untersuchten Proteins bestimmen. Die Protein-Leiter besteht aus Proteinen definierter Größe.

Falls die Aminosäure-Sequenz bekannt ist, kann das Molekulargewicht durch Addition der Molekulargewichte der einzelnen Aminosäuren errechnet werden. In dieser Arbeit wurde dafür das Programm "EditSeq" (DNASTAR) genutzt.

### **3.2.4 Charakterisierung der überexprimierten Proteine**

#### **3.2.4.1 Bestimmung von pH-, Temperatur- und Zeit-Optima**

Die Enzymansätze wurden im 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 5 bis 6,5 und 0,1 M Tris-HCl Puffer pH 7,0 bis 9,0 für 15 min bei 35 °C inkubiert. Für jede Inkubation wurde 5 µg Enzym eingesetzt. Beim ermittelten optimalen pH-Wert wurde eine weitere Enzymansatz-Serie bei verschiedenen Temperaturen zwischen 20 °C und 45 °C inkubiert.

Bei optimalen pH- und Temperatur-Werten wurden eine weitere Enzymansatz-Serie bei verschiedenen Zeit zwischen 0 und 30 min inkubiert.

Mittels HPLC-Analyse der Produktmengen lassen sich der optimale pH-Wert, die optimale Temperatur und die optimale Zeit für die Enzymreaktion ermitteln.

#### **3.2.4.2 Untersuchung der Substratspezifität**

Bei optimalem pH-Wert, optimaler Temperatur und optimaler Zeit wurden 4 µg des rekombinanten und mutierten Proteins mit verschiedenen Starter-Substraten (10 µl) inkubiert. Als Kettenverlängerer diente Malonyl-CoA (10 µl). Folgende Substrate wurden eingesetzt: Benzoyl-CoA, 2-Hydroxybenzoyl-CoA, 3-Hydroxybenzoyl-CoA, 4-Hydroxybenzoyl-CoA, Isobutyryl-CoA, Isovaleryl-CoA, Butyryl-CoA, Hexanoyl-CoA, Octanoyl-CoA, *p*-Cumaroyl-CoA, Cinnamoyl-CoA und Acetyl-CoA. Nach erfolgter Inkubation wurden die Ansätze mit 50 %iger Essigsäure versetzt und zwei Mal mit dem Enzymansatzvolumen Ethylacetat extrahiert. Die Gemische wurden bei 13000 rpm für 10 min zentrifugiert. Die Ethylacetatphase wurde im Vakuum eingengt und in je 50 µl 50 %igem Methanol aufgenommen und mittels HPLC analysiert.

Parallel zu den Ansätzen wurden die Starter-Substrate auch mit [2-<sup>14</sup>C] Malonyl-CoA (2,2 kBq) inkubiert und die Ansätze mittels Radiodetektor-gekoppelter HPLC analysiert.

#### **3.2.4.3 Bestimmung von kinetischen Daten**

Die  $K_m$  und  $K_{cat}$  -Werte für die bevorzugten Substrate jedes überexprimierten Enzyms wurden ermittelt. Dazu wurden 2 µg Protein mit verschiedenen Substrat-Konzentrationen im pH- und Temperatur-Optimum 10 min inkubiert. Die Konzentrationen lagen zwischen  $0,2-5 \times K_m$ . Das zweite Substrat wurde zu jeder Reaktion in der Sättigung zugegeben. Die



quantitative Analyse der mit zunehmender Substratkonzentration zunehmenden Produktmengen erfolgte durch HPLC-DAD.

Die  $K_m$ -Werte wurden mit dem Programm „Hyper32“ (hyperbolic regression programme for the analysis of enzyme kinetic data) berechnet (<http://homepage.ntlworld.com/john.easterby/software.html>).

### **3.2.5 High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC)**

Die Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie diente zur Identifizierung und quantitativen Bestimmung der Inkubationsprodukte. Bei diesem Verfahren werden Substanzgemische nach ihren Bindungseigenschaften zwischen einer stationären und einer mobilen Phase aufgetrennt. Als stationäre Phase dienten verschiedene C18-Umkehrphasen, während die mobile Phase von Methanol/Wasser-Gemischen gebildet wurde. Das Mischverhältnis der mobilen Phase wurde über verschiedene Gradientenprogramme gesteuert und die Detektion erfolgte über einen DAD mittels online-UV.

#### **UV-HPLC**

##### **❖ Instrumentierung**

HPLC : Agilent Technologies, 1260 Infinity

Säule: Hypersil GOLD (5 µm; 150 mm, 4.6 mm)

Pumpe: Agilent Technologies, 1260 Infinity Quat. Pump VL

Detektor: Agilent Technologies, 1260 Infinity DAD VL

Fließmittel: Methanol : Wasser (pH 2,25, Phosphorsäure)

Flussrate: 0,5 ml / Min.

Injektionsvolumen: 20 µl

Software: Agilent Chemstation

##### **❖ Fließmittel (mobile Phase)**

Sämtliche Auftrennungen der Analysenprodukte sowie die Identifizierungs- und Charakterisierungs-Chromatogramme wurden mit einem binären Gradienten ermittelt. Hierbei wurden Reinstwasser (mit Phosphorsäure auf pH 2,25 eingestellt) und Methanol für HPLC eingesetzt.

Die Flussrate betrug 0,5 ml/min. Die Zusammensetzung des Eluenten wurde nach folgendem Schema zeitlich variiert (Tab. 3.2.1).

Tab. 3.2.1 : HPLC-Gradient

	Zeit (min)	Methanol –Anteil (%)	Wasser –Anteil (%)	Wellenlänge (nm)
BUS, BPS, CHS, VPS, Phlorbutyrophenon	0	30	70	286
	5	30	70	306
	17	60	40	290
	25	60	40	286
	27	70	30	286
	30	100	0	
	35	30	70	
	40	30	70	
Andere Polyketid- Synthasen	0	40	60	282, 286
	2	40	60	
	20	80	20	
	25	80	20	
	26	100	0	
	29	100	0	
	30	40	60	
	35	40	60	
Hyperforin	0	10	90	274
	10	30	70	
	20	60	40	
	30	80	20	
	40	85	15	
	45	90	10	
	50	95	5	
	55	98	2	
	65	100	0	
	75	10	90	
	80	10	90	

**Radio-HPLC**

**❖ Instrumentierung**

HPLC: Agilent 1200 Series; Binary Pump, Vacuum Degaser, Standard Autosampler, Thermostatted Column Compartment (Agilent Technologies Inc., USA)

Säule: HyperClone 5µ ODS (C18) 120 A, 150 x 2,0 mm (Phenomenex Inc., Canada)

Radio-Detektor: RAMONA Star 2, Quarztube 5,5 mm, 0,37 ml, Korngröße 45-63 µm (Raytest GmbH, Deutschland)

Software: Gina Star 4.06

**❖ Fließmittel (mobile Phase)**

Als Eluenten wurden Reinstwasser (mit Phosphorsäure auf pH 2,25 eingestellt) und Methanol für HPLC eingesetzt. Die Zusammensetzung des Eluenten wurde nach folgendem Schema zeitlich variiert (Tab. 3.2.1). Die Flussrate betrug 1 ml/min.

### 3.2.6 HPLC-MS

#### ❖ Probenbereitung

Ein Extrakt (10 µl) aus *H. perforatum* subsp. *angustifolium*-Wurzeln und eine Inkubation der Tripel-Mutante (1 ml) wurden analysiert, wobei verschiedene Substrate benutzt wurden.

#### ❖ Instrumentierung

HPLC: Agilent 1100 series HPLC (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland)

Säule: C18 Säule HyperClone 5 µm (150 mm x 4.60 mm) (Phenomenex)

Software: Analysis v.3.3, Bruker Daltonics

Die Detektion der MS-Signale erfolgte über ein Esquire 3000 ESI ion-trap Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland).

#### ❖ Fließmittel (mobile Phase)

Die mobile Phase bestand aus LC-MS-Methanol (B) und Wasser (A), die jeweils 0,1% Ameisensäure enthielten. Die Zusammensetzung des Eluenten wird nach folgendem Schema zeitlich variiert (Tab. 3.2.1). Die Flussrate betrug 0.5 ml/min.

### 3.2.7 Elizitierung von Zellsuspensionskulturen

Das Wachstum von *Hypericum perforatum* subsp. *angustifolium* Zellkulturen in BDS-Flüssigmedium und nach Chitosan (25 mg.L<sup>-1</sup>)-Elizitierung wurde charakterisiert.

Eine Reihe von Kolben mit 50 ml Medium wurde mit 3 g Zellmasse angeimpft. Vom 0. bis zum 3. Tag wurden die Zellen eines Kolbens immer zur gleichen Tageszeit durch Vakuumfiltration abgeerntet.

#### 3.2.7.1 Chitosan Vorbereitung

Chitosan (ein Polymer aus β-1,4-Glucosaminresten) ist ein effektiver Elizitor, der zur Stimulation der Bildung von sekundären Metaboliten verwendet wird (Pitta-Alvarez und Giulietti, 1999; Komaraiah et al., 2002; Chakraborty et al., 2008). Die Chitosan-Stammlösung (25 mg.L<sup>-1</sup>) wurde nach Pitta-Alvarez und Giulietti (1999) hergestellt. Eine konzentrierte Chitosan-Lösung wurde durch Lösen des Polymers in 1% (v/v) Essigsäure hergestellt. Der pH-Wert wurde auf 5,5 mit 1 N NaOH eingestellt und sterilisiert durch Autoklavieren bei 120 ° C und 1 atm für 20 Minuten. Die Lösung wurde bei 4 ° C aufbewahrt.

### 3.2.8 Enzym-Extraktion

Alle Arbeitsschritte wurden bei 4° C durchgeführt. Die Zellen von *Hypericum perforatum* subsp. *angustifolium* wurden nach 3, 6, 9, 12, 15, 18 und 21 Stunden sowie 1, 2 und 3 Tagen abgeerntet. Um phenolische Verbindungen zu binden, die Proteine inaktivieren können, wurden 5,0 g Zellen mit 0,5 g Polyclar®AT (Serva, Heidelberg, Deutschland) versetzt. Nach Zugabe von Seesand wurden die Zellen in einem Mörser in 5,0 ml 100 mM HEPES-Puffer, pH 8,0, der 10 mM Dithiothreitol (DTT) enthielt, 10 min auf Eis homogenisiert und anschließend 20 min bei 9000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand war der zellfreie Enzymrohextrakt.

### 3.2.9 Entfernung von niedermolekularen Verbindungen

Eine HPLC-Analyse von Enzyminkubationen wird durch die Gegenwart von niedermolekularen Stoffen erschwert. Deren nahezu vollständige Abtrennung aus einem Proteinextrakt wurde durch den Einsatz von PD<sub>10</sub>-Säulen (Amersham Biosciences) nach den Angaben des Herstellers erreicht. Die Säule wurde mit 25 ml Kaliumphosphat-Puffer (oder Tris-Puffer), pH 7-7,5 äquilibriert. Anschließend wurden 2,5 ml des Rohextrakts auf die Säule aufgetragen. Die hochmolekulare Fraktion wurde mit 3,5 ml des gleichen Puffers eluiert. Das Eluat wurde zur Proteinbestimmung nach Bradford und für Inkubationen eingesetzt.

### 3.2.10 Polyketid-Synthase-Ansätze

Alle Bestandteile eines Inkubationsansatzes (Tab. 3.2.2) wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bei 35 °C für 30 min inkubiert. Eine Probe mit denaturiertem Enzym diente als negative Kontrolle. Dazu wurde die Enzymlösung vor Zugabe der restlichen Reaktionsbestandteile 30 min gekocht. Nach der Inkubation wird der Enzymansatz mit 50%iger Essigsäure (Endkonzentration 1 %) versetzt und zwei Mal mit dem Enzymansatzvolumen Ethylacetat extrahiert. Um eine schnelle und saubere Phasentrennung zu erhalten, werden die Gemische bei 13000 rpm für 10 min zentrifugiert. Die Ethylacetatphase wurde im Vakuum eingengt. Für die HPLC-Analyse (3.2.5) wurde der Rückstand in 50 µl 50%igem Methanol aufgenommen, wovon 20 µl injiziert wurden.

**Tab. 3.2.2:** Zusammensetzung von PKS-Ansätzen

Stammlsg.		Menge der Stammlsg.	Endkonzentration
Isobutyrophenon-Synthase			
Isobutyryl-CoA	0,47 mM	10 µl	18,1 µM
Malonyl-CoA	0,47 mM	10 µl	18,1 µM
Enzym (Extrakt)			100 µg Rohextrakt
Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0	0,1 M	ad 250 µl	
Benzophenon-Synthase			
Benzoyl-CoA	0,23 mM	10 µl	9,9 µM
Malonyl-CoA	0,47 mM	10 µl	18,1 µM
Enzym (Extrakt)			100 µg Rohextrakt
Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0	0,1 M	ad 250 µl	
Chalkon-Synthase			
p-Cumaroyl-CoA	66,7 µM	20 µl	7,6 µM
Malonyl-CoA	0,47 mM	10 µl	18,1 µM
Enzym (Extrakt)			100 µg Rohextrakt
Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0	0,1 M	ad 250 µl	

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Nach den Untersuchungen von Tekelova et al. (2000) liegen in intakten *H. perforatum*-Pflanzen hohe Hyperforin-Konzentrationen in den Knospen, Blüten und Früchten vor. Der Hyperforin-Gehalt macht in 3 mm großen Knospen 2,5 % des Trockengewichts aus und steigt bis zu 7 % in den 9 - 13 mm großen Knospen an. Früchte enthalten zudem 2 % Adhyperforin, dessen Gehalt in Blüten mit 0,2% noch relativ gering ist (Maisenbacher und Kovar, 1992). Nach den Angaben von Tekelova et al. (2000) wurden in der vorliegenden Arbeit, um eine HpBUS cDNA zu klonieren, etwa 5 mm große Knospen und Blüten als mRNA-Quelle geerntet.

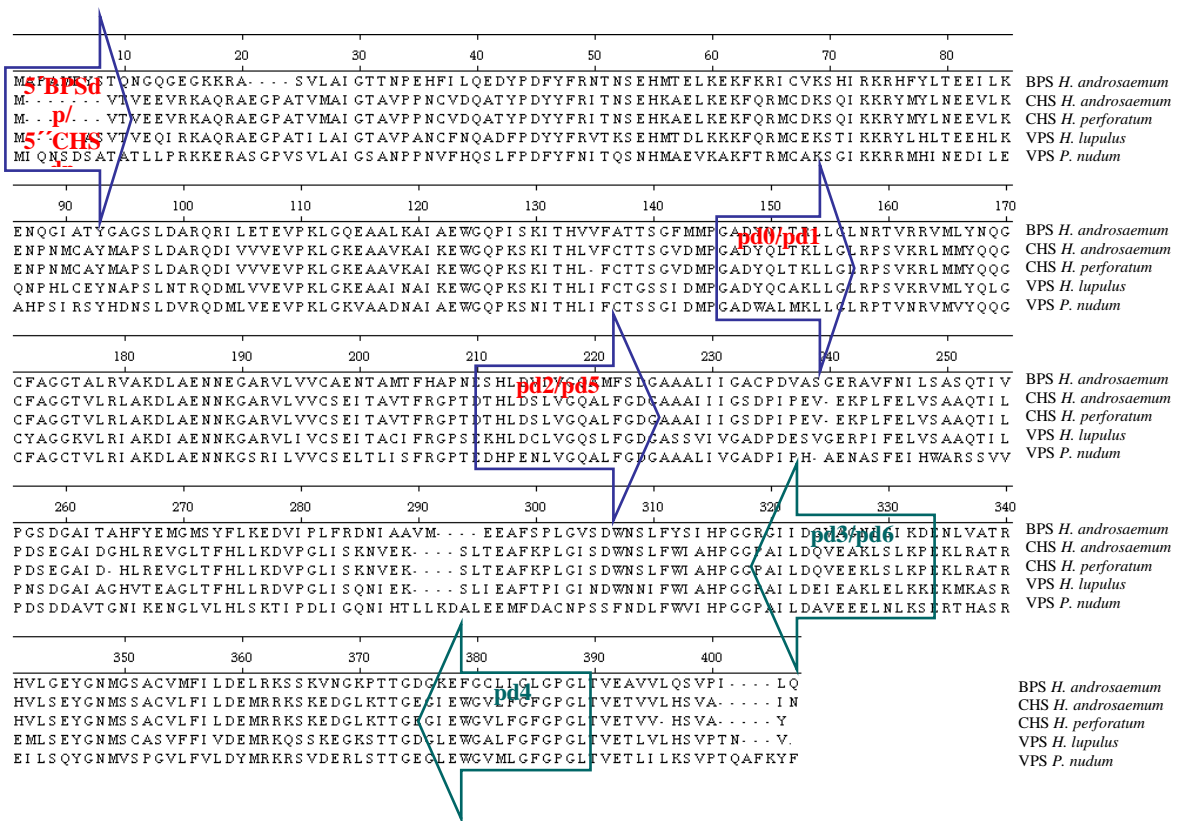
Untersuchungen von Klingauf et al. (2005) an Zellkulturen von *H. calycinum* zeigten, dass die BUS-Aktivität innerhalb eines Tages nach Überimpfung in BDS-Medium ansteigt. Daher wurde, um weitere neue PKS cDNAs zu klonieren, Gesamt-RNA aus den *H. calycinum*-Zellkulturen in diesem Zeitraum isoliert.

Auf der Basis der analytischen Untersuchungen von Gronquist et al. (2001) an intakten *H. calycinum*-Pflanzen wurden Fruchtknoten aus Knospen und Blüten sowie Früchte geerntet und dienten als Frischmaterial für die Isolierung von Gesamt-RNA.

### 4.2 Design von degenerierten Primern

Beim Vergleich ausgewählter Typ III PKS aus der Datenbank ergab sich eine Homologie über die gesamte Aminosäuresequenz von 48 bis 97 % (Tab. 4.1). Allerdings gibt es konservierte Bereiche, von denen sich degenerierte Primer ableiten lassen, um neue PKS III-Fragmente zu isolieren. Für die Amplifikation der gesuchten PKS-cDNAs wurden sechs strangabwärts (5'BPSdp, 5'CHSdp, pd0, pd1, pd2 und pd5) und drei strangaufwärts gerichtete (pd3, pd4 und pd6) Primer entworfen. Sie leiteten sich von den konservierten Regionen der bekannten PKS-Sequenzen ab (Abb. 4.1). Standen für eine Basenposition im Primer alle vier Nukleotide zur Auswahl, wurde Inosin verwendet. Inosin besitzt die Eigenschaft, mit allen vier Nukleotiden stabile Wasserstoffbrücken zu bilden (Kwok et al., 1997). Ein mit Inosin modifizierter Primer steigert die sonst durch den Einbau von A, T, G oder C verringerte Wahrscheinlichkeit der Hybridisierung mit dem Zielmolekül. Theoretisch sollten durch Verwendung dieser Primer in der PCR bei niedrigen Anlagerungs-Temperaturen (40 – 55 °C) unterschiedliche PKS-Fragmente mit höheren oder

niedrigeren Homologien zu bekannten PKS amplifiziert werden. Erwartet wurden Fragmente sowohl der BUS als auch der CHS und BPS.



**Abb. 4.1:** Vergleich der Aminosäuren-Sequenzen von fünf ausgewählten PKS III (BPS und CHS aus *H. androsaemum*, CHS aus *H. perforatum*, VPS aus *Humulus lupulus* sowie *Psilotum nudum*). Die Pfeile markieren konservierte Regionen für die Ableitung strangaufwärts bzw. -abwärts gerichteter Primer.

**Tab. 4.1:** Prozentuale Identität von ausgewählten PKS auf Aminosäuren-Ebene

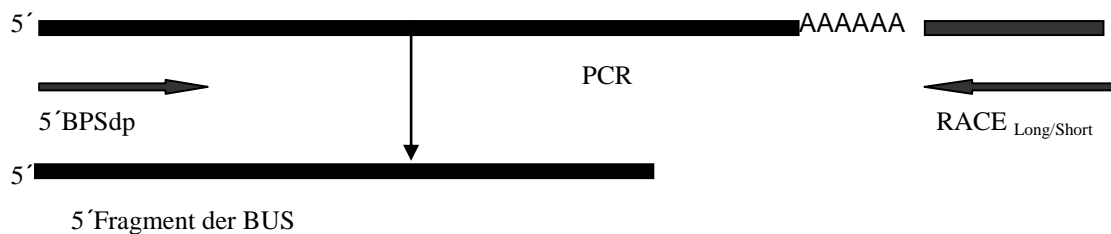
Identität (%)	1	2	3	4	5
1 BPS <i>H. androsaemum</i>		58.2	56.0	52.9	47.3
2 CHS <i>H. androsaemum</i>			97.2	72.3	58.5
3 CHS <i>H. perforatum</i>				69.7	56.7
4 VPS <i>Humulus lupulus</i>					55.7
5 VPS <i>Psilotum nudum</i>					

4.3 Klonierung von BUS-Transkript aus *H. perforatum*

4.3.1 Amplifikation eines HpBUS cDNA-Fragments

Für die Amplifikation von mutmaßlichem HpBUS cDNA-Fragment aus *H. perforatum* diene als *Sense*-Primer einer der degenerierten Primer (5' BPSdp) in Kombination mit einem 1:4-Gemisch aus den beiden universellen RACE<sub>long</sub> und RACE<sub>short</sub> Anker-Primern (Abb. 4.2). Die PCR erfolgte nach dem Touchdown-Verfahren beginnend bei 55 °C, wobei

die Anlagerungs-Temperatur in den folgenden 10 Zyklen um jeweils 1 °C reduziert wurde. Es folgten 20 weitere Zyklen bei der zuletzt erreichten Temperatur. Als Matrize diente 1 µl des cDNA-Pools aus *H. perforatum*-Knospen, der in der reversen Transkription synthetisiert wurde. Als PCR-Produkt wurde ein Fragment mit 96% Identität zur BPS von *H. perforatum* (ABP49616.1) erhalten. Dieses Fragment begann mit dem Start-Codon ATG. Es fehlte nur das 3'-Ende, das mit 3'-RACE-PCR amplifiziert wurde.



**Abb. 4.2:** Schema der PCR zur Amplifikation eines HpBUS-cDNA-Fragments

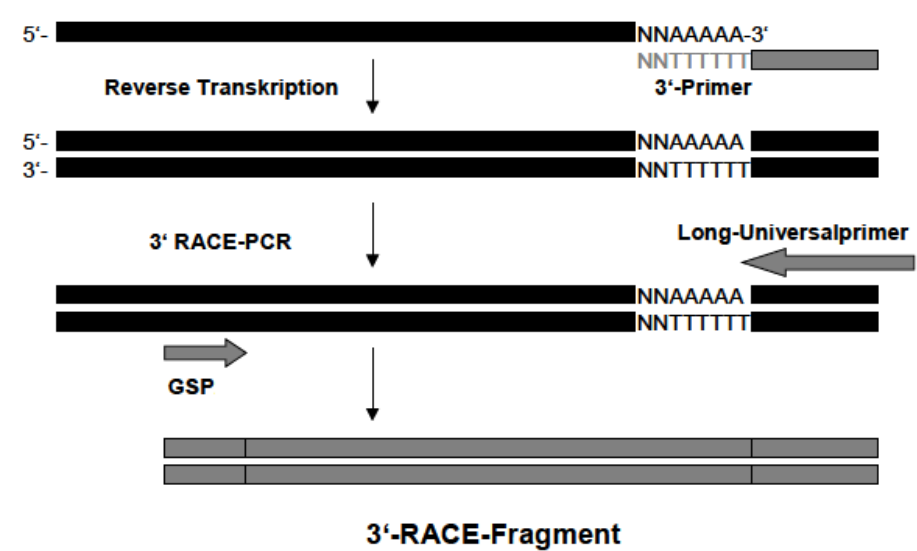
#### 4.3.2 Gewinnung der vollständigen HpBUS-cDNA

Die RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends) stellt eine schnelle und sensitive Methode für die Amplifizierung der 3'-Enden von HpBUS-cDNA dar (Frohman et al. 1988). Die RACE-Technik lässt sich in 3'-RACE und 5'-RACE unterteilen, wobei mit Ersterer eine Verlängerung zum 3'-terminalen poly(A<sup>+</sup>)-Bereich erreicht wird und das davor liegende Translations-Stoppodon eingeschlossen ist (Abb. 4.3).

Um das gesuchte 3'-Ende zu amplifizieren, wurden drei weitere genspezifische Sense-Primer synthetisiert. Im Folgenden wurde mit dem RACE<sub>long</sub>-Primer und einem genspezifischen Sense-Primer eine PCR nach 3.1.7 durchgeführt. Ein Mikroliter der PCR-Produkt-Lösung wurde entnommen und als Matrize für die anschließende Nested-PCR eingesetzt. Hierfür wurden ein etwas abwärts gelegener genspezifischer Sense-Primer und der RACE<sub>short</sub>-Primer benutzt. Um die Spezifität noch weiter zu erhöhen, wurde zum Teil eine dritte Reaktion mit dem dritten Sense-Primer und einem 1:4 Gemisch aus den beiden universellen Primern RACE<sub>long</sub> und RACE<sub>short</sub> vorgenommen.

Die PCR mit diesen Primerpaaren lieferte Produkte, die im mittleren Bereich etwa 80 bzw. 130 bp überlappten, um die Teilsequenzen zuordnen zu können. Mit Hilfe des „SeqMan“ Programms konnten die resultierenden Teilsequenzen zu einer vorläufigen Gesamtsequenz zusammengefügt werden, die den kompletten ORF (offenen Leserahmen) für die HpBUS-cDNA enthielt.

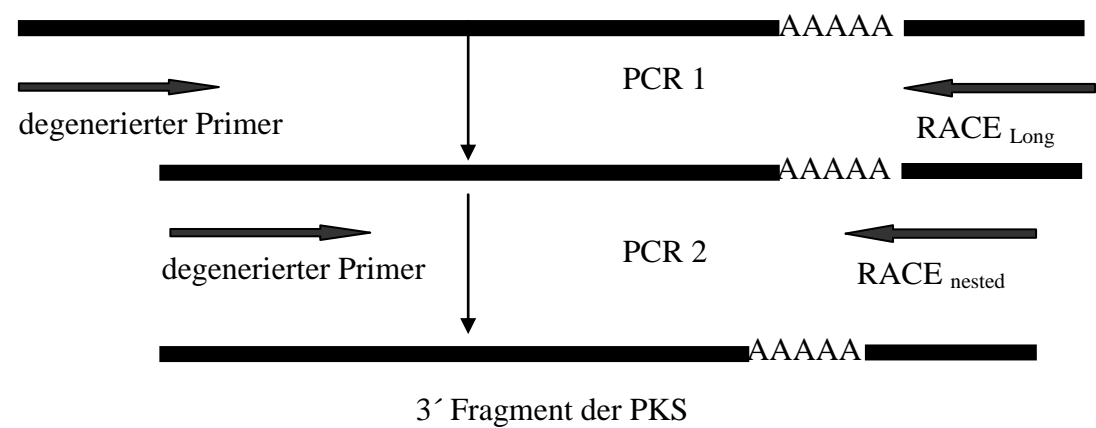




**Abb. 4.3:** Prinzip der 3' RACE. Der Long-Universalprimer war der RACE<sub>long</sub>, ggf. der RACE<sub>long/short</sub> Primer. GSP war einer der genspezifischen Primer, konstruiert für das gegebene Fragment

**4.4 Amplifikation weiterer PKS-Fragmente mit degenerierten Primern**

Der Amplifikation diente als *Sense*-Primer einer der degenerierten Primer in Kombination mit einem zweiten degenerierten *Reverse*-Primer oder mit dem RACE<sub>long</sub>- bzw. RACE<sub>short</sub>-Primer (Abb. 4.4 - 4.6). Die erwartete Größe der Produkte lag zwischen 400 und 1200 bp. Als Matrize dienten cDNAs aus *H. calycinum*-Zellkulturen, die zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Überimpfung in BDS-Medium geerntet wurden. Die PCR wurde nach den Angaben in Tab. 4.2 durchgeführt. Die gewonnenen cDNA-Fragmente wurden kloniert und sequenziert.



**Abb. 4.4:** Schema der PCR mit RACE- und degenerierten Sense-Primern

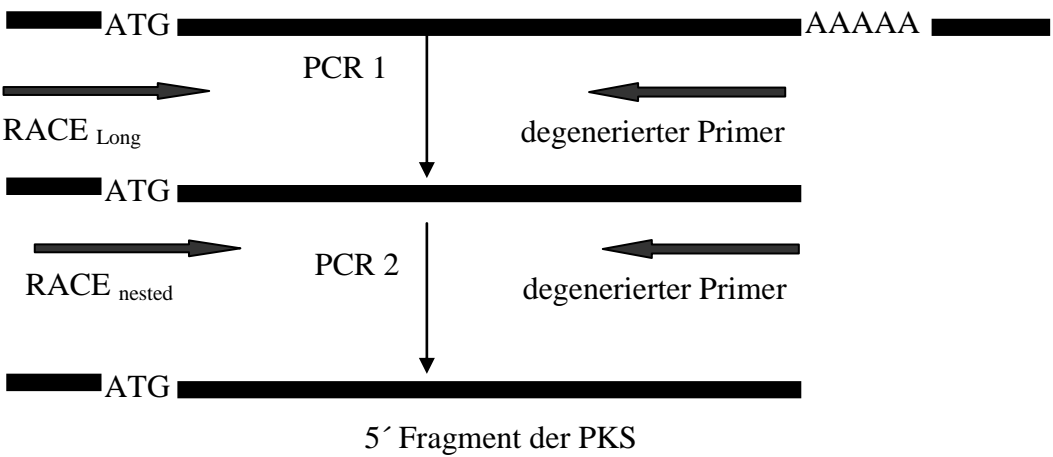


Abb. 4.5: Schema der PCR mit RACE- und degenerierten Reverse-Primern

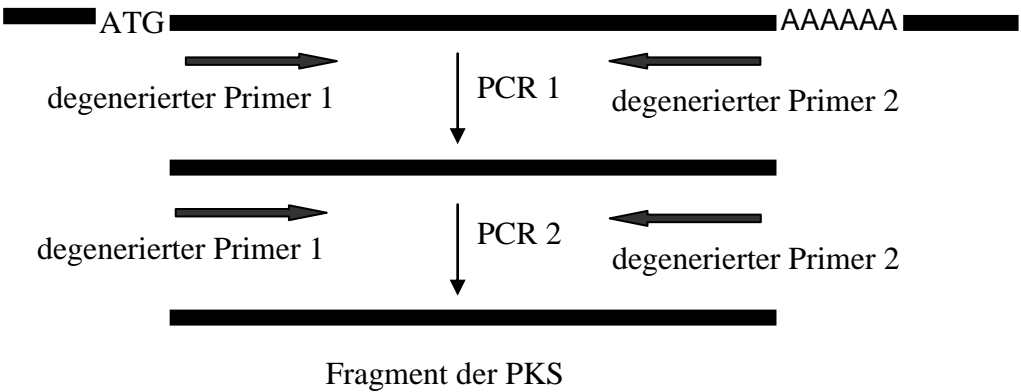


Abb. 4.6: Schema der PCR mit degenerierten Sense- und degenerierten Reverse-Primern

**Tab. 4.2:** Die 27 möglichen Kombinationen von degenerierten Primern mit erwarteten Größen

Primer	5´BPSdp	5´CHSdp	pd0	pd1	pd2	pd5	RACE <sub>long</sub> / Short
pd3	900 bp 1	900 bp 2	600 bp 3	600 bp 4	400 bp 5	1100 bp 6	900 bp 7
pd6	900 bp 8	900 bp 9	600 bp 10	600 bp 11	400 bp 12	400 bp 13	900 bp 14
pd4	1100 bp 15	1100 bp 16	1000 bp 17	1000 bp 18	600 bp 19	600 bp 20	1100 bp 21
RACE <sub>long</sub> / Short	1200 bp 22	1200 bp 23	1100 bp 24	1100 bp 25	720 bp 26	720 bp 27	

Die Ergebnisse der PCR mit degenerierten und RACE-Primern werden in der folgenden Tabelle präsentiert.

+: PCR-Produkt bei erster Amplifikation, ++: PCR-Produkt bei erster und zweiter Amplifikation, -: kein PCR-Produkt

*Nach 2 Stunden*

	5´BPSdp	5´CHSdp	pd0	pd1	pd2	pd5	Rls
pd3	-	-	++	++	-	-	+
pd6	++	-	++	++	+	+	-
pd4	-	-	-	-	-	-	-
Rls	+	-	-	-	++	+	

*Nach 4 Stunden*

	5´BPSdp	5´CHSdp	pd0	pd1	pd2	pd5	Rls
pd3	-	-	-	-	-	+	-
pd6	++	-	++	-	-	++	-
pd4	-	+	-	-	-	-	+
Rls	++	++	++	-	-	+	

Nach 6 Stunden

	5'BPSdp	5'CHSdp	pd0	pd1	pd2	pd5	Rls
pd3	+	-	+	+	++	++	++
pd6	++	-	+	+	++	++	-
pd4	+	+	-	-	-	-	-
Rls	-	-	-	-	-	+	

Nach 8 Stunden

	5'BPSdp	5'CHSdp	pd0	pd1	pd2	pd5	Rls
pd3	-	-	+	+	-	-	+
pd6	-	-	-	-	-	+	+
pd4	-	-	-	-	-	-	-
Rls	-	-	-	-	-	-	

Nach 12 Stunden

	5'BPSdp	5'CHSdp	pd0	pd1	pd2	pd5	Rls
pd3	-	-	-	-	-	-	+
pd6	+	-	-	+	-	-	+
pd4	-	-	-	-	-	-	+
Rls	-	+	-	-	+	+	

Nach 18 Stunden

	5'BPSdp	5'CHSdp	pd0	pd1	pd2	pd5	Rls
pd3	-	-	-	+	-	-	++
pd6	+	+	+	+	++	++	++
pd4	-	-	-	-	-	-	++
Rls	-	++	-	-	++	++	

Nach 20 Stunden

	5'BPSdp	5'CHSdp	pd0	pd1	pd2	pd5	Rls
pd3	-	-	+	-	-	-	++
pd6	+	-	++	+	+	++	+
pd4	-	-	-	-	-	-	+
Rls	-	+	-	-	++	++	

Nach 24 Stunden

	5'BPSdp	5'CHSdp	pd0	pd1	pd2	pd5	Rls
pd3	-	-	++	++	-	-	++
pd6	++	+	-	+	++	++	++
pd4	-	-	-	-	-	-	++
Rls	-	++	-	++	++	++	

4.4.1 Klonierung und Sequenzierung der gewonnenen Fragmente

Die Größe der PCR-Produkte wurde immer mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese überprüft (3.1.8). Nach der Auftrennung wurde das cDNA-Fragment aus dem Gel eluiert und in den pGEM-T easy-Vektor der Firma Promega ligiert (Abb. 4.7). Da die *Taq*-Polymerase an die amplifizierte Sequenz ein Adenin anfügt, war keine Restriktion vor der Ligation notwendig. Nach der Transformation in kompetente *E. coli* DH5 $\alpha$ -Zellen wurden die Klone angezogen und selektiert (3.1.15.1). Aus den erhaltenen Klonen wurde über alkalische Lyse die Plasmid-DNA isoliert (3.1.16) und mit den dafür erforderlichen Restriktionsenzymen verdaut (für den am häufigsten verwendeten pGEM-Vektor war das *Eco*RI). Alternativ wurde eine Kontroll-PCR für die einklonierten Fragmente durchgeführt. Mit zwei plasmidspezifischen Primern wurde die PCR nach einem Standardprotokoll gestartet. Der Restriktionsansatz oder das PCR-Produkt wurden auf einem Agarosegel (1 %) elektrophoretisch aufgetrennt, um die Größe zu überprüfen.

Die Plasmid-DNA wurde wie in 3.1.17 beschrieben nach der Didesoxyterminations-Methode (Sanger et. al. 1977) sequenziert. In der Regel konnten dabei, abhängig von der Qualität der DNA und der elektrophoretischen Auftrennung, ca. 300-500 Basen pro Lauf gelesen werden.

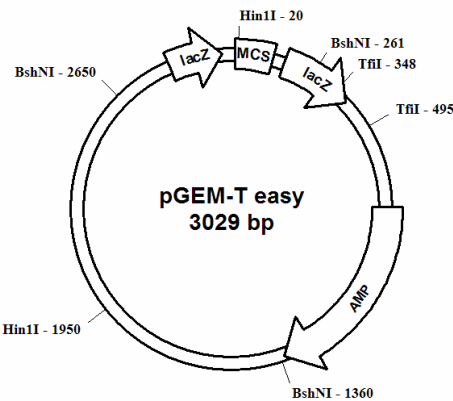


Abb. 4.7: Restriktionsschnittstellen im pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vektor

Für die Sequenzierung der Plasmid-DNA wurde das automatische Sequenzier-System von Applied Biosystems (Modell 377) verwendet. Die erhaltenen Basensequenzen und die daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen wurden mittels des Softwareprogramms von Lasergene 99 DNA STAR bearbeitet. Für initiale Ähnlichkeitssuchen oder Datenbankvergleiche mit bekannten DNA- und Aminosäuresequenzen wurden die Großdatenbanken des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA) mit der enthaltenen BLAST Suchoption (Altschul et al., 1997) genutzt.

4.4.2 Sequenz-Analyse der gewonnenen cDNA-Fragmente

Die Analyse der Sequenzen zeigte, dass nur zwei neue Fragmente kloniert wurden. Die anderen Fragmente haben eine Übereinstimmung zwischen 98% und 100% mit BPS und CHS.

cDNA PKS1 (2 Stunden nach der Elizitierung)

Die Kombination der degenerierten Primer dp1 und dp6 führte in der cDNA-Probe 2 Stunden nach Elizitierung zur Amplifikation der cDNA HcPKS1, die ebenfalls hohe Homologie zur PKS1 aus *H. perforatum* (HpPKS1; Karppinen 2007) zeigte (Abb. 4.8).

5'.....TTTACTTGGCTCACGAGCTCGGCTGAGGAGCGATGTCCGTCGTGTGATGCTCTACTTT  
CTAGGCTGTTATGGTGGTGTACGGGCCTGAGAGTCGCCAAGGACATAGCCGAGAACAACCCGG  
GAAGCCGCGTGCTGTTAACACCTCCGAGACTACAATACTCGGCTTCCGCCACCAAGCAATGCT  
CGGCCTTACGATCTTGTAGGAGCTGCACTCTTCGGTGATGGCGCAGCAGCTGTGATCATCGGCAC  
CAACCCTGTCGCGGGTAAGGAGTCCCCATTTCATGGAAGTGAAGTATGCAACTCAGCAGTTCCTTC  
CGGGAACACAGAACGTAATCGACGGGcGTCTCACGGAGGAGGGCATAAATTTCAAGCTCGGTAG  
GGACCTTCCTCAGAAGGTTGAAGACAACATCGAGGAGTTCTGCAAGAAGATCATGTCCAAGGST  
GGTCTGACCGAGTTCAACGACATGTTCTGGGCTGTCCACCCCGCGGCCCGGCATAATC.....3'

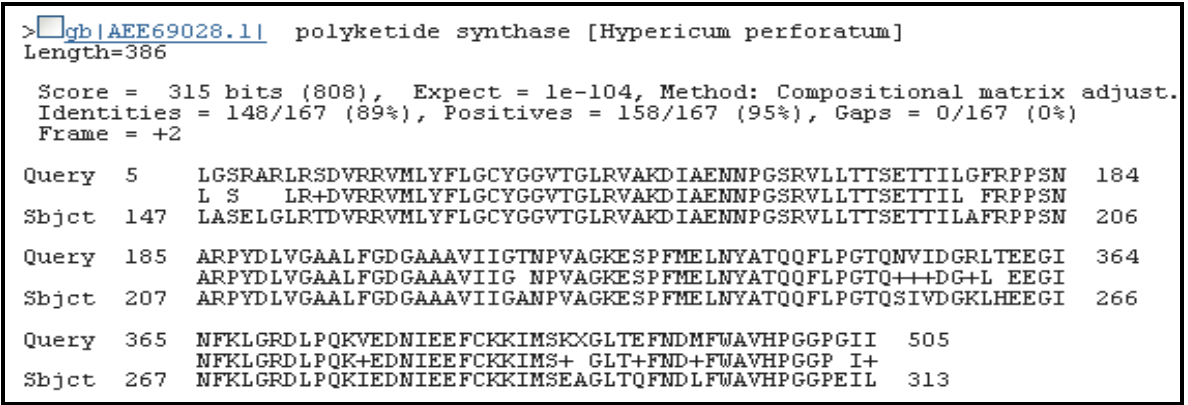


Abb. 4.8: Aminosäuren-Sequenz und Datenbank-Vergleich des cDNA PKS1-Fragments (2 Stunden nach Elizitierung).

**cDNA PKS2 (24 Stunden nach Elizitierung)**

Verwendet wurden die zwei degenerierten Primern dp1 und dp3. Das führte zur Amplifikation des cDNA-Fragments aus dem Pool nach 24 Stunden, welches hohe Ähnlichkeit zur CHS aus *Garcinia mangostana* aufwies (Abb. 4.9).

5'.....ATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGGAATTCAGTAGTGATTAAGGCGATAAAA  
GAATGGGGCCAGCCCAAGTCCAAGATCACCCACCTCGTCTTCTGCACCACCTCCGGCGTTGACAT  
GCCCCGGCGCCGACTACCAGCTCACCGAGCTCCTAGGACTCCGCCCCACGTCAAGCGCCTCATGA  
TGTACCAGCAGGGCTGCTTCGCCGGCGGCACCGTTCTCCGCCTCGCCAAGGACCTCGCCGAGAAC  
AACCGCGGCTCACGTGTCCTCGTCGTCTGCTCCGAGATCACGGCCGTACCTTCCGCGGGGCCCTC  
GGAGACCCACCTCGACTCCATGGTGGGACAGGCCCTCTTCGGTGACGGAGCAGCCGCCGTCATC  
GTCGGTGCCGACCCCGACCCGGTACTCGAGAAACCCCTCTTCCAGCTGGTCTCAGCGTCCCAGAC  
CATCCTGCCGGAATCCGAGGGGGCCATCGACGGCCACCTGAGGGAGGTGGGTCTGACCTTCCAC  
CTGCTCAAGGACGTGCCCCGGGCTCATCTCGAAGAACATAGAGAAGAGCCTGGTGGAGGCGTTCA  
AGCCCATAGGGATCAGCGACtGGAACtCCCTCTTctGGATCGCCCACCCC.....3'

>gb ACM62742.1  chalcone synthase [Garcinia mangostana]				
Length=394				
Score = 350 bits (898), Expect = 2e-117, Method: Compositional matrix adjust.				
Identities = 179/206 (87%), Positives = 196/206 (95%), Gaps = 0/206 (0%)				
Frame = +1				
Query	1	MVDLQAAANSLVIKAIKEWGQPKSKITHLVFCTTSGVDMPGADYQLTELLGLRPHVKRLM	180	
		+V++ +KAIKEWGQPKSKITHLVFCTTSGVDMPGADYQLT+LLGLRPHVKRLM		
Sbjct	100	VVEIPKLGKEAAVKAKEWGQPKSKITHLVFCTTSGVDMPGADYQLTKLLGLRPHVKRLM	159	
Query	181	MYQQGCFAGGTVLRLAKDLAENNRGSRVLVVCSEITAVTFRGPSETHLDSMVGQALFgdg	360	
		MYQQGCFAGGTVLRLAKDLAENN+G+RVLV+CSEITAVTFRGPS+THLDS+VGQALFGDG		
Sbjct	160	MYQQGCFAGGTVLRLAKDLAENNKGARVLVICSEITAVTFRGPSDTHLDSLVGQALFGDG	219	
Query	361	aaavivgadpdpvLEKPLFQLVSASQTILPDSEGAIDGHLREVGLTFHLLKDVPGLISKN	540	
		AAA+IVG+DPPD +E+PLFQ+VSA+QTILPDS+GAIDGHLREVGLTFHLLKDVPGLISKN		
Sbjct	220	AAAIIVGSDPDPAIERPLFQIVSAAQTILPDSGGAIDGHLREVGLTFHLLKDVPGLISKN	279	
Query	541	IEKSLVEAFKPIGISDWNLSLFWIAHP	618	
		IEKSLVEAF PIGISDWNLSLFWIAHP		
Sbjct	280	IEKSLVEAFTPIGISDWNLSLFWIAHP	305	

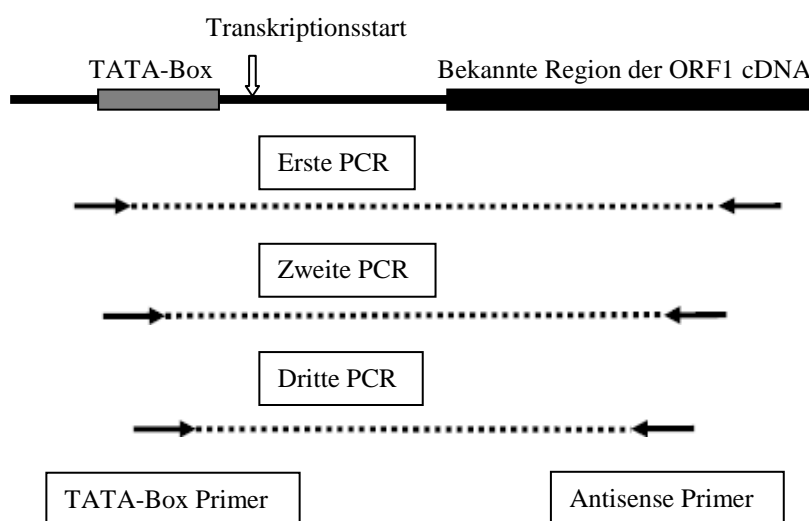
**Abb. 4.9:** Aminosäuren-Sequenz und Datenbank-Vergleich des cDNA PKS2-Fragments (24 Stunden nach Elizitierung). Dieses mittlere Fragment hat 99% Identität mit HcORF1 (Meva Meva, 2009).

**4.5 Korrektur des 5'-Endes von HcORF1**

Meva Meva (2009) hat HcORF1 aus *H. calycinum*-Knospen kloniert. Dieses Fragment, das kein 5'Ende hatte, hat 86 % Übereinstimmung mit der CHS aus *H. perforatum*. Um den vollständigen ORF zu amplifizieren, wurde eine semi-nested PCR mit einem degenerierten TATA-BOX-Primer durchgeführt (Schramm et al., 2000; Scotto-Lavino et al., 2006). Dafür wurde genomische DNA nach 3.1.4 isoliert. Diese wurde in drei aufeinanderfolgenden Touch-down PCR-Reaktionen als Matrize verwendet (3.1.7.1). Als Sense-Primer diente ein degenerierter Primer, der an der TATA-Box binden sollte. Als Antisense-Primer wurden HcORF1 Reverse 1, 2 und 3 eingesetzt (Abb. 4.10). Es kam zur Amplifikation spezifischer

Produkte mit Überlappungen von 120 bp mit HcORF1. Das PCR-Produkt war 257 bp lang (116 bp 5'-unbekannte Region und 141 bp bekannte Region mit Start-Codon ATG)

```
TATAAATATCTAANTACGAGCCCTCTCACTCTCCACATCCCAATAGCCAAACCAAACCAAACA
GACCAACCTTCTACACACAGAATCAAAAAGCCAGTCAAGAAATATCATATAATATGGCACCC
TCCATCGAGGAGATCAGGAATGCCAGAGGGCAGATGGCCCCGCCACCGTGCTCGCCATCGG
CACCGCCACCCCGGCTCACTGCGTCCTCCAATCCGAGTACCCCGACTATTACTTCCGCATTAC
CAAAGCG
```



**Abb. 4.10:** Schematische Darstellung der semi-nested TATA-BOX-PCR

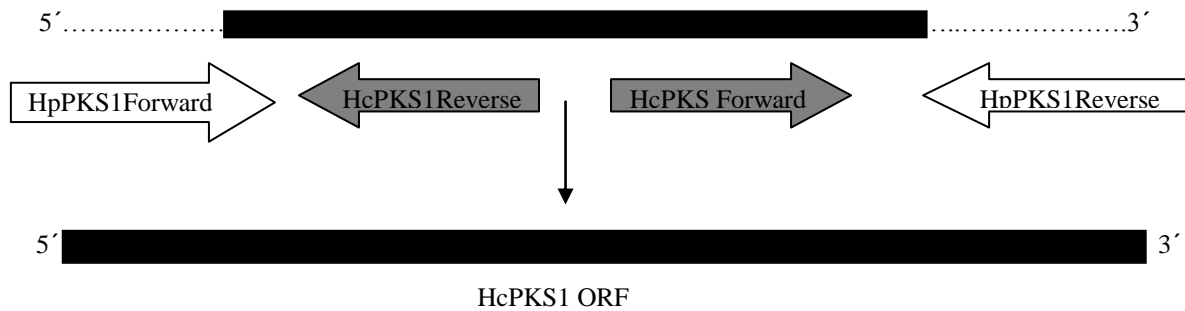
#### 4.6 Gewinnung der vollständigen HcPKS1-cDNA

Um die gesuchte cDNA für die HcPKS1 vollständig zu amplifizieren, wurden weitere genspezifische Primer synthetisiert (HcPKS1 Forward, HcPKS1 Reverse). HcPKS1 hat eine hohe Homologie mit HpPKS1. Deswegen wurden zwei genspezifische Sense- und Reverse-Primer für HpPKS1 entworfen.

Um das 5'-Ende zu amplifizieren, wurde eine Standard-PCR mit Sense-Primer HpPKS1 (HpPKS1Forward) und HcPKS1 Reverse-Primer durchgeführt.

Um das 3'-Ende zu amplifizieren, wurde eine zweite Standard-PCR mit Reverse-Primer HpPKS1 (HpPKS1 Reverse) und HcPKS1 Sense-Primer vollzogen (Abb. 4.11).



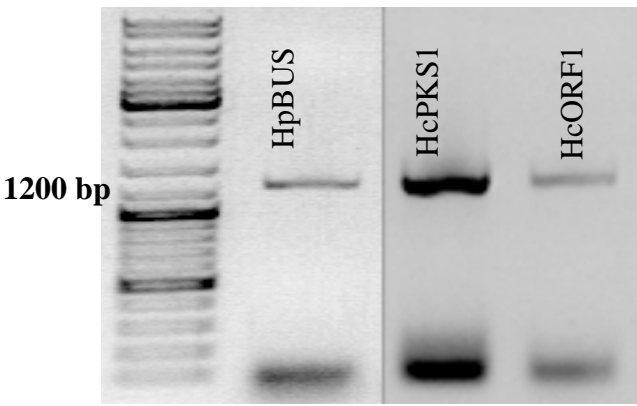


**Abb. 4.11:** Gewinnung der vollständigen HcPKS1-cDNA

#### 4.7 Amplifikation von ORFs für die heterologe Expression

In der resultierenden HpBUS-cDNA und den HcPKS1-HcORF1-cDNAs wurden mit dem Programm „Editseq“ die ORFs, d.h. die für die Enzyme kodierenden Basensequenzen, lokalisiert. Um die ORFs heterolog zu exprimieren, mussten sie zunächst fehlerfrei aus dem cDNA-Pool reamplifiziert werden. Dazu wurden Überexpressionsprimer synthetisiert und in einer PCR mit der korrekturlesenden *Pfu*-Polymerase eingesetzt (3.1.7). Die Expressionsprimer wurden so konstruiert, dass sie jeweils eine andere Restriktionsschnittstelle (2.9.6) enthielten, um die ORFs in den Expressionsvektor in sense-Richtung ligieren zu können.

Die ORFs aus den beiden *Hypericum*-Spezies wurden wie folgt reamplifiziert. Für die HpBUS-cDNA wurde als Matrize eine poly(A<sup>+</sup>)-RNA aus *H. perforatum* Blüten mit dem 5'CDS-Primer in cDNA umgeschrieben. Als Matrize für HcORF1 diente cDNA aus *H. calycinum*-Knospen und für HcPKS1 diente als Matrize cDNA aus *H. calycinum*-Zellkulturen. Da bei der herkömmlichen PCR mit *Taq*-Polymerase eine Fehlerrate von  $8,0 \times 10^{-6}$  auftritt, wurde, wie oben erwähnt, die korrekturlesende *Pfu*-DNA-Polymerase eingesetzt. Diese Polymerase besitzt eine ausgeprägte 3'→5' Exonuclease-Aktivität und die Fehlerrate liegt nur bei  $1,3 \times 10^{-6}$  (Cline et al., 1996). Im Gegensatz zu der *Taq*-Polymerase fügt die *Pfu*-Polymerase an die amplifizierte Sequenz keinen Adenin-Rest an, sodass das Produkt glatte Enden (blunt ends) aufweist. Auf einem Agarosegel erschien die erwartete Bandengröße, die bei ca. 1200 bp lag (Abb. 4.12).



**Abb. 4.12:** Agarose-Gelelektrophorese der drei klonierten PKS-ORFs

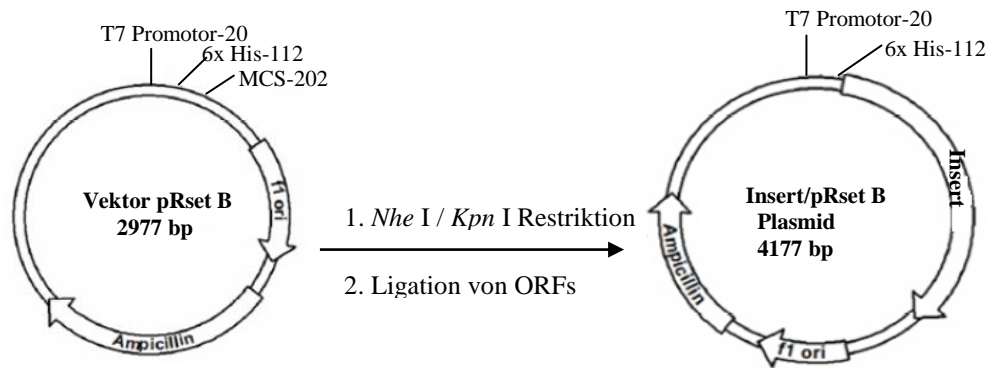
Mit Hilfe des Programms „Ediktes“ wurden die Basensequenzen in Aminosäuresequenzen umgeschrieben und die Molekülmassen der resultierenden Polypeptide errechnet. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 4.3 zusammengefasst.

**Tab. 4.3:** Eigenschaften der klonierten PKSs

	Aminosäuren	Basen	M [Da]	Isoel. Punkt
<b>HpBUS</b>	395	1188	42,63	6,14
<b>HcPKS1</b>	386	1161	42,43	5,80
<b>HcORF1</b>	395	1188	43,23	6,41

Die mittels Gelextraktion aufgereinigten PCR-Produkte wurden mit den Restriktionsenzymen *Kpn* I und *Nhe* I verdaut. Zuvor wurden die entsprechenden PKS-Sequenzen auf das Vorkommen der *Kpn* I und *Nhe* I Schnittstellen überprüft. Anschließend wurden sie in den mit *Nhe* I und *Kpn* I geschnittenen Expressionsvektor pRset-B kloniert (Abb. 4.13) und zur Vermehrung in *E. coli* DH5α transformiert.

Der pRset-B Vektor ist so aufgebaut, dass am N-Terminus des exprimierten Enzyms eine Sequenz von 6 Histidin-Resten angehängt ist. Histidin besitzt eine hohe Anlagerungsaffinität zu zweiwertigen Kationen wie z. B. Ni<sup>2+</sup>.



**Abb. 4.13:** Expressionsvektor pRset-B

Nach einer 12-20-stündigen Kultivierung der Bakterien auf LB-Medium mit Ampicillin und Chloramphenicol als Selektionsmarker wurde aus den positiven Klonen die Plasmid-DNA isoliert. Mit den vektorspezifischen Primern (5'pRset-B und 3'pRset-B) wurde eine erste Sequenzierung in beiden Richtungen durchgeführt. Nach der Überprüfung der Sequenzen wurde eine Transformation in den *E. coli* Stamm BL21 durchgeführt.

## 4.8 Heterologe Expression der klonierten PKS

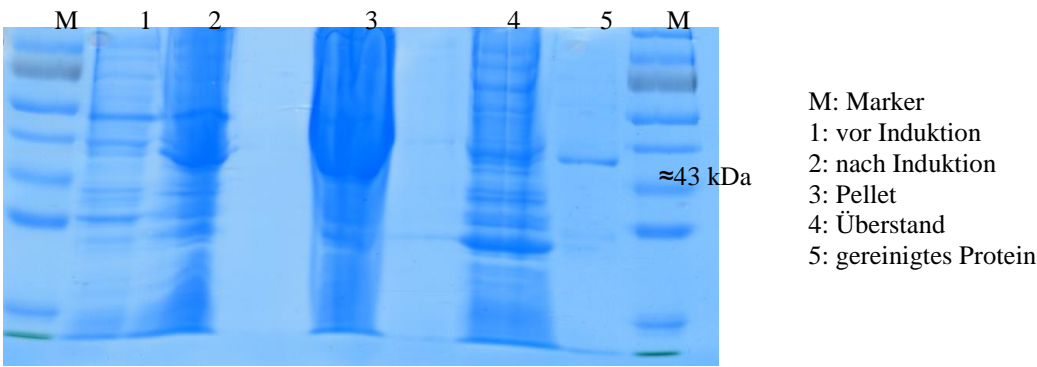
Die rekombinanten Proteine wurden als Fusionsproteine mit einem N-terminalen Histidinhexamer exprimiert, wodurch eine Reinigung der rekombinanten Proteine mit Hilfe der Ni-NTA-Affinitätschromatographie ermöglicht wurde.

Vier Stunden nach Induktion mit IPTG wurden die Bakterien geerntet und durch Ultraschall aufgebrochen (Zellaufschluss). Die anschließende Zentrifugation trennte die lösliche von der unlöslichen Proteinfraction. Die lösliche Proteinfraction wurde mit Ni-Agarose für eine Stunde inkubiert und nach 3.2.1.1 aufgereinigt. Die Konzentration des isolierten rekombinanten Proteins wurde nach Bradford (3.2.2) bestimmt.

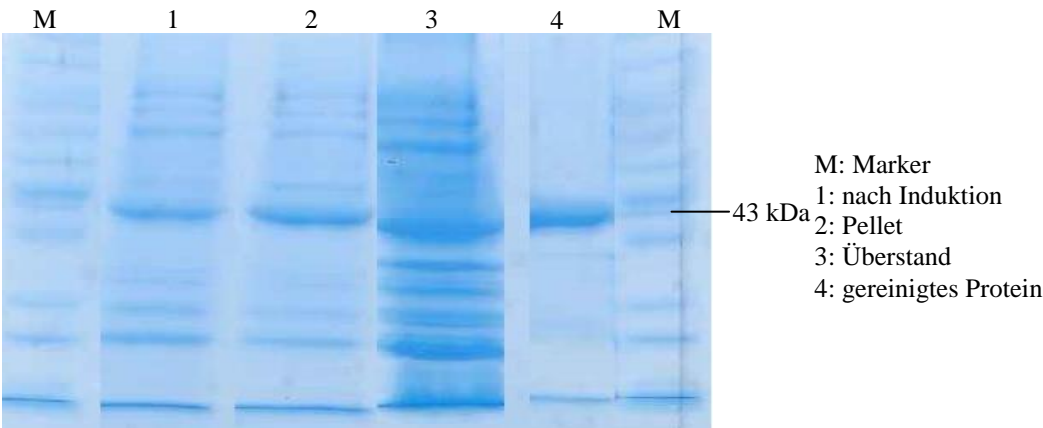
### 4.8.1 Kontrolle der heterologen Expression

Zur Kontrolle der Überexpression und der Effektivität der Aufreinigung wurden die rekombinanten Proteine über SDS-PAGE analysiert (3.2.3). Das Elektrophoresegel ist ein Molekularsieb, das aus langen Acrylamid-Polymeren besteht, die durch Bisacrylamid quervernetzt sind. Proteine werden durch Erhitzen in Gegenwart von  $\beta$ -Mercaptoethanol und SDS denaturiert. SDS lagert sich an die Proteine an, die dadurch eine einheitliche negative Ladung erhalten, die in einem direkten Verhältnis zu ihrer Masse steht. Die Eigenladung der Proteine ist dadurch vollständig überdeckt und die Wanderungsgeschwindigkeit hängt nur von ihren Molekülmassen ab.

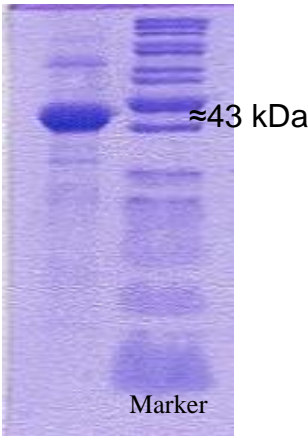
Im SDS-Gel ist nach Coomassie-Färbung (Abb. 4.14 - 4.16) für alle drei Proteine bei ca. 43 kDa eine deutliche Bande zu sehen, nachdem die Expression mit IPTG stimuliert wurde. Vor der Induktion sind die Proteine im Zellextrakt nicht vorhanden.



**Abb. 4.14:** SDS-PAGE von Bakterienextrakten und gereinigter HpBUS



**Abb. 4.15:** SDS-PAGE von Bakterienextrakten und gereinigtem HcORF1-Protein



**Abb. 4.16:** SDS-PAGE gereinigter HcPKS1

## 4.9 Test auf enzymatische Aktivität

Um die Aktivität der rekombinanten PKSs zu prüfen, wurden verschiedene Starter-Substrate zusammen mit Malonyl-CoA benutzt: Benzoyl-CoA, 2-Hydroxybenzoyl-CoA, 3-Hydroxybenzoyl-CoA, 4-Hydroxybenzoyl-CoA, Isobutyryl-CoA, Isovaleryl-CoA, Butyryl-CoA, Hexanoyl-CoA, Octanoyl-CoA, *p*-Cumaroyl-CoA, Cinnamoyl-CoA und Acetyl-CoA.

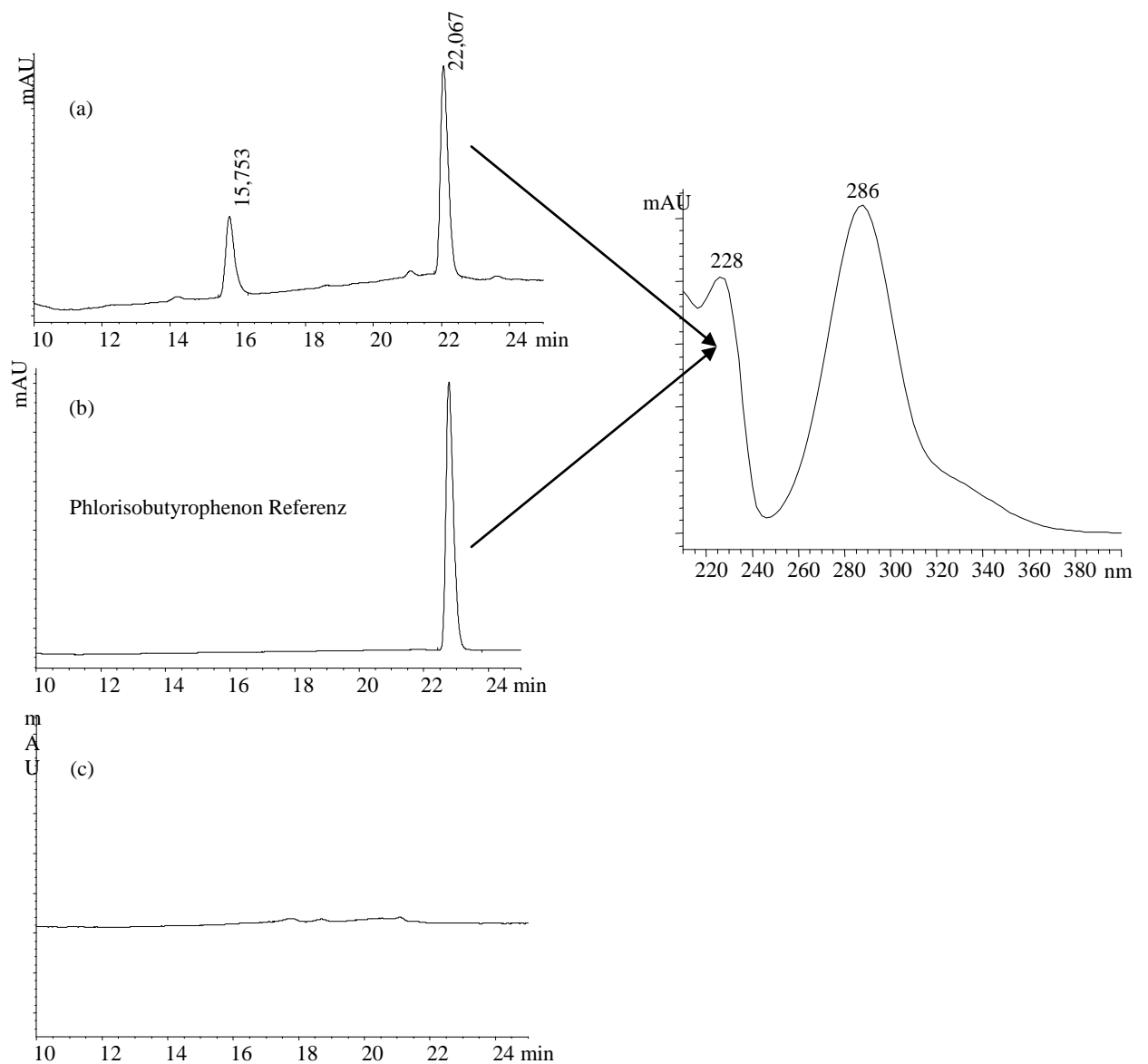
### 4.9.1 Überprüfung der Aktivität der HcPKS1 und des HcORF1-Proteins

Nach der Inkubation der rekombinanten HcPKS1 und des HcORF1-Proteins mit den obigen Startern konnte leider keine Bildung von enzymatischen Produkten nachgewiesen werden. Beide Enzyme waren inaktiv. Die Expressionen und Inkubationen wurden zweimal mit dem selben Ergebnis wiederholt.

### 4.9.2 Überprüfung der Aktivität der HpBUS

Die Inkubation dieses rekombinanten Proteins mit den verschiedenen Starter-Substraten ergab eine 100 %ige Aktivität mit Isobutyryl-CoA (Abb. 4.17) und ca. 95 %ige relative Aktivität mit Benzoyl-CoA (Abb. 4.18).

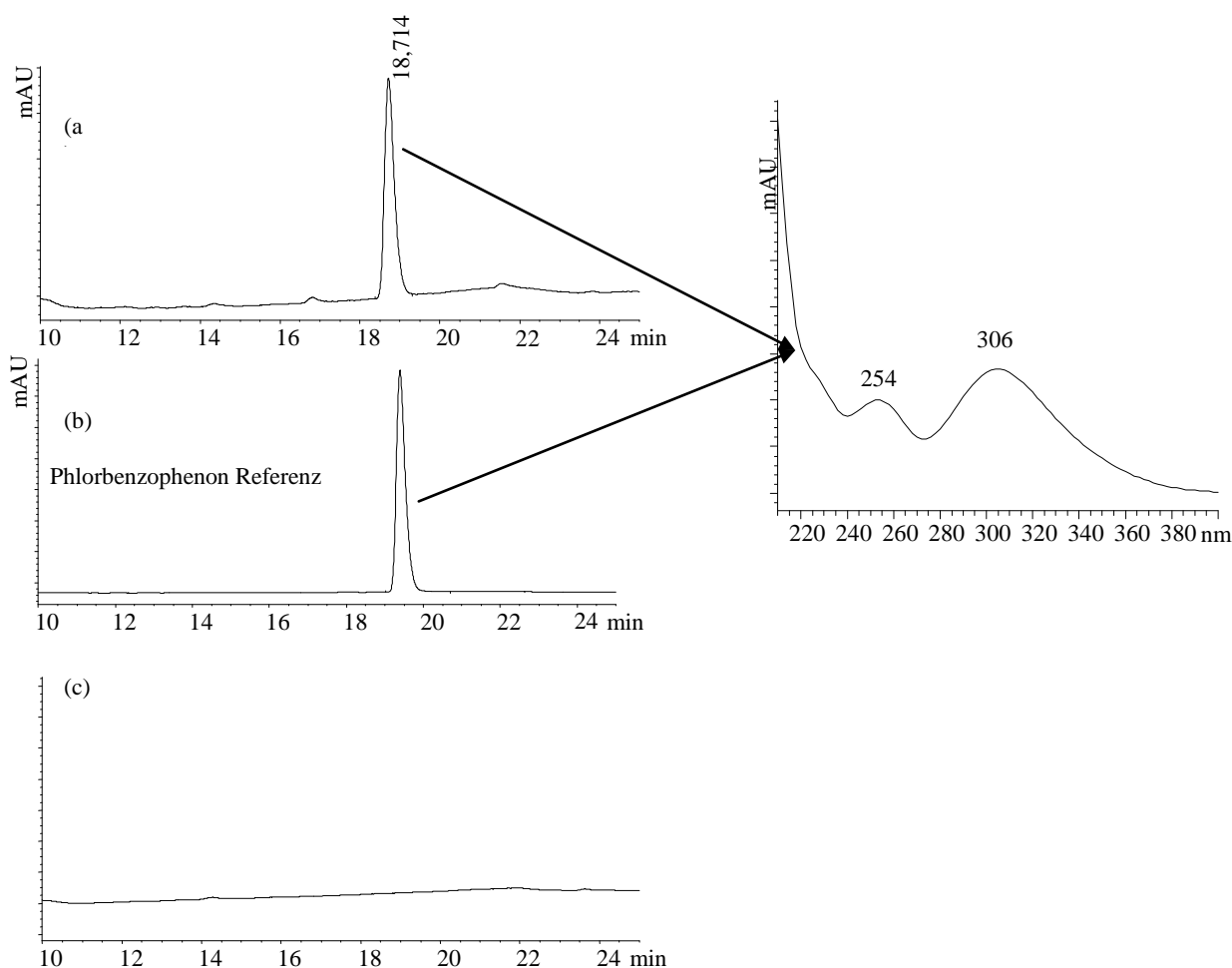
Die Ausbeute des Proteins war 0,2 mg L<sup>-1</sup> Bakterienkultur. Das Protein verlor nach einem Tag bei -20°C und mit 20% Glycerin seine Aktivität.



**Abb. 4.17:** HPLC-Analyse der Inkubation der rekombinanten HpBUS mit Isobutyryl-CoA

- (a) Inkubation mit Isobutyryl-CoA
- (b) Authentische Referenzsubstanz Phlorisobutyrophenon
- (c) Inkubation mit gekochtem Protein

In der Inkubation wird neben dem Phlorisobutyrophenon (Peakfläche: 96,8 mAU) ein Nebenprodukt gebildet (Peakfläche: 41,9 mAU).



**Abb. 4.18:** HPLC-Analyse der Inkubation der rekombinanten HpBUS mit Benzoyl-CoA

- (a) Inkubation mit Benzoyl-CoA (Peakfläche des Produkts: 83,291 mAU)
- (b) Phlorbenzophenon Referenz
- (c) Inkubation mit gekochtem Protein

## 4.10 Charakterisierung der rekombinanten HpBUS

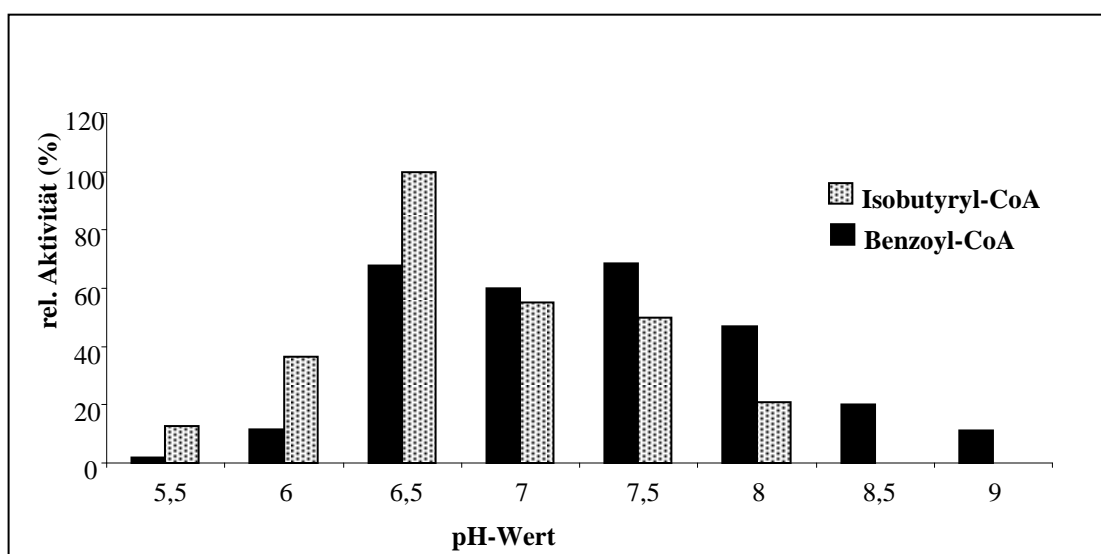
Um dieses Enzym zu charakterisieren, wurden neben der Substratspezifität, die pH-, Temperatur- und Zeit-Optima sowie die kinetischen Daten ermittelt.

### 4.10.1 Bestimmung des pH-Optimums

Der pH-Wert hat eine entscheidende Auswirkung auf die Enzymaktivität. Säuren und Basen beeinflussen die Ladung der Aminosäuren und zerstören die zur Funktion notwendige Konformation. Die bekannten PKS III besitzen ein pH-Optimum von etwa 7, deshalb wurden für die Inkubationen Phosphatpuffer pH 5-6,5 und Trispuffer pH 7-9 eingesetzt. Die Wirkung der pH-Variation auf die Produktbildung nach der Inkubation mit sowohl

Isobutyryl-CoA als auch Benzoyl-CoA wurde analysiert (Abb. 4.19). Die Produkte wurden mittels HPLC unter Verwendung von Standardlösungen des Phlorisobutyrophenons und Phlorbenzophenons quantifiziert.

Nach Abb. 4.19 ergab sich, dass das Enzym bei pH 6,5 maximale Aktivität mit Isobutyryl-CoA hatte und sich ab pH 7,0 mehr Produktbildung mit Benzoyl-CoA als mit Isobutyryl-CoA ergab. Die Temperatur- und Zeitoptima wurden für Isobutyryl-CoA bei pH 6,5 ermittelt.

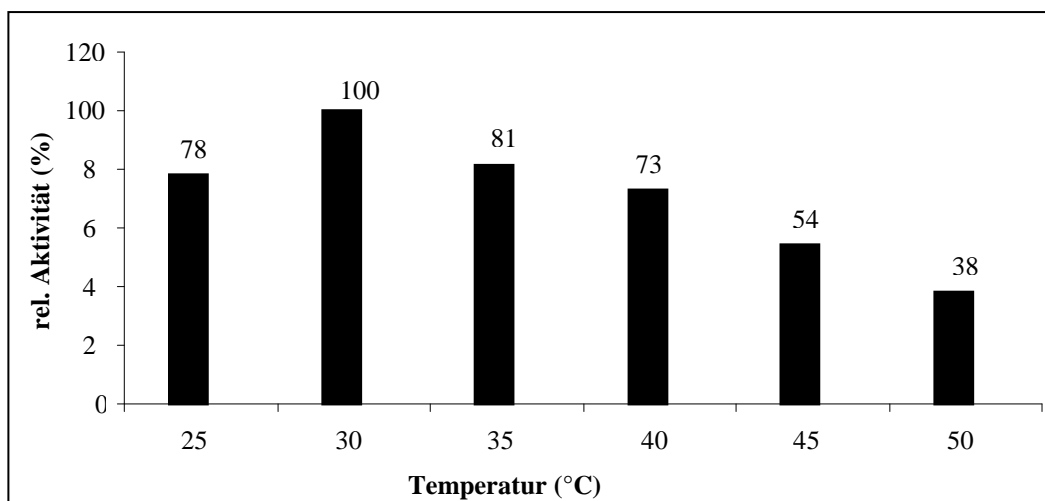


**Abb. 4.19:** Aktivität von HpBUS mit Isobutyryl-CoA und Benzoyl-CoA bei verschiedenen pH-Werten

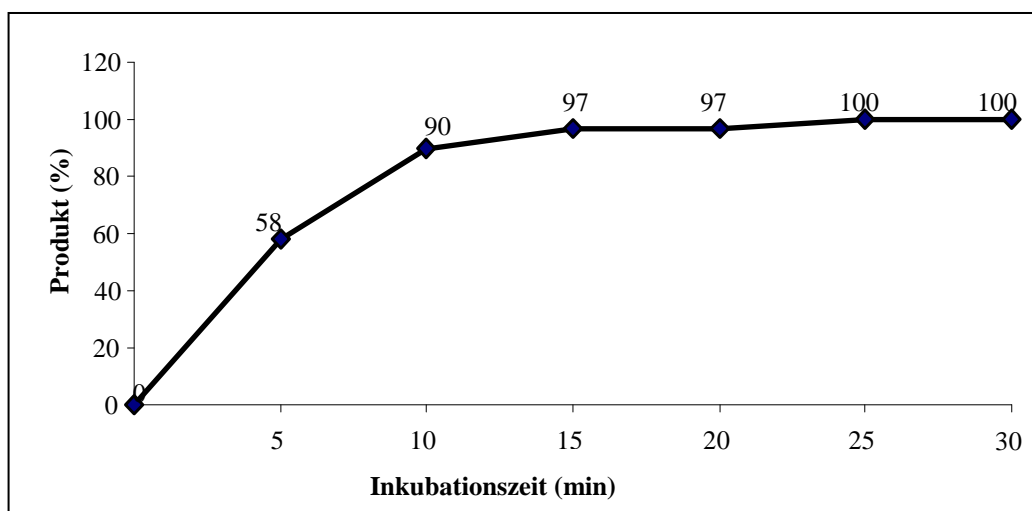
#### 4.10.2 Bestimmung des Temperatur-und Zeitoptimums

Die relative Geschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion steigt bis zu einer bestimmten Temperatur an. Bei höheren Temperaturen werden durch zu große thermische Bewegungen die intramolekularen Bindungen, die die Proteinstruktur stabilisieren, zerstört. HpBUS wurde 10 min bei 25, 30, 35, 40, 45 und 50 °C inkubiert und die gebildeten Produktmengen wurden mittels HPLC bestimmt. Die optimale Temperatur lag bei 30 °C (Abb. 4.20). Die Produktbildung war über annähernd 10 min linear (Abb. 4.21).





**Abb. 4.20:** Temperaturoptimum der HpBUS



**Abb.4.21:** Zeitabhängigkeit der Produktbildung durch HpBUS

#### 4.10.3 Substratspezifität

Beim pH- und Temperaturoptimum wurden 4 µg des rekombinanten Proteins mit aromatischen sowie aliphatischen Substraten für 10 min inkubiert. Als Kettenverlängerung diente sowohl normales Malonyl-CoA als auch [2-<sup>14</sup>C] Malonyl-CoA (2,2 kBq). Die gebildeten Produkte wurden quantifiziert und die Enzymaktivitäten in pkat/mg angegeben.

Als Referenz-Substanz für das Hauptprodukt mit Benzoyl-CoA und 3-Hydroxybenzoyl-CoA diente Phlorbenzophenon. Die Nebenprodukte bei beiden Substrate wurden mit 6-Phenyl-4-hydroxypyron quantifiziert. Für alle anderen Substrate diente als Referenz-

Substanz für das Hauptprodukt Phlorisobutyrophenon und für das Nebenprodukt 6-Methyl-4-hydroxypyron.

❖ *Inkubationen mit unmarkiertem Malonyl-CoA:*

Bezüglich der Substratspezifität wurde bei pH 6,5 die höchste Umsatzrate mit Isobutyryl-CoA, dann mit Benzoyl-CoA erzielt. Das Enzym ist eine Isobutyrophenon-Synthase (BUS). 2-Hydroxybenzoyl-CoA, 4-Hydroxybenzoyl-CoA, Acetyl-CoA, *p*-Coumaroyl-CoA und Cinnamoyl-CoA wurden nicht akzeptiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.4 zusammengefasst.

**Tab. 4.4:** Substratspezifität der HpBUS

Substrat	Hauptprodukt pKat/mg	Nebenprodukt pKat/mg	Summe pKat/mg
Benzoyl-CoA	295,02	5,86	300,88
Isobutyryl-CoA	310,31	50,56	360,87
3-Hydroxybenzoyl-CoA	34,31	1,62	35,93
Isovaleryl-CoA	155,8	65,86	221,66
Butyryl-CoA	44,66	115,4	160,06
Hexanoyl-CoA	0	85,87	85,87
Octanoyl-CoA	0	80,48	80,48
<i>p</i> -Cumaroyl-CoA	0	0	0
Cinnamoyl-CoA	0	0	0
2-Hydroxybenzoyl-CoA	0	0	0
4-Hydroxybenzoyl-CoA	0	0	0
Acetyl-CoA	0	0	0

❖ *Inkubationen mit [2-<sup>14</sup>C] Malonyl-CoA*

Um eine exakte Quantifizierung aller Produkte und Nebenprodukte auch ohne Vorliegen der jeweiligen Referenzsubstanzen zu erzielen, wurde [2-<sup>14</sup>C] Malonyl-CoA als Kettenverlängerer benutzt. Die Radiochromatogramme nach der Inkubation mit Isobutyryl-CoA und Benzoyl-CoA sind in Abb. 4.22 bzw Abb. 4.23 präsentiert.

Die Peakfläche-Analyse ergab, dass das bevorzugte Substrat des Enzyms Isobutyryl-CoA ist. Die Aktivität des Proteins mit den anderen aliphatischen und aromatischen Substraten wurde ebenfalls überprüft. Die Ergebnisse sind in Prozent-Aktivität präsentiert (Tab. 4.5).

**Tab. 4.5:** Substratspezifität der HpBUS in Gegenwart von [2-<sup>14</sup>C] Malonyl-CoA

Substrat	Hauptprodukt(%)	Nebenprodukt(%)
Benzoyl-CoA	99	15
Isobutyryl-CoA	100	105,5
3-Hydroxybenzoyl-CoA	7	3
Isovaleryl-CoA	57,6	129
Butyryl-CoA	21,35	173,46
Hexanoyl-CoA	0	117
Octanoyl-CoA	0	107
<i>p</i> -Cumaroyl-CoA	0	0
2-Hydroxybenzoyl-CoA	0	0
Cinnamoyl-CoA	0	0
4-Hydroxybenzoyl-CoA	0	0
Acetyl-CoA	0	0

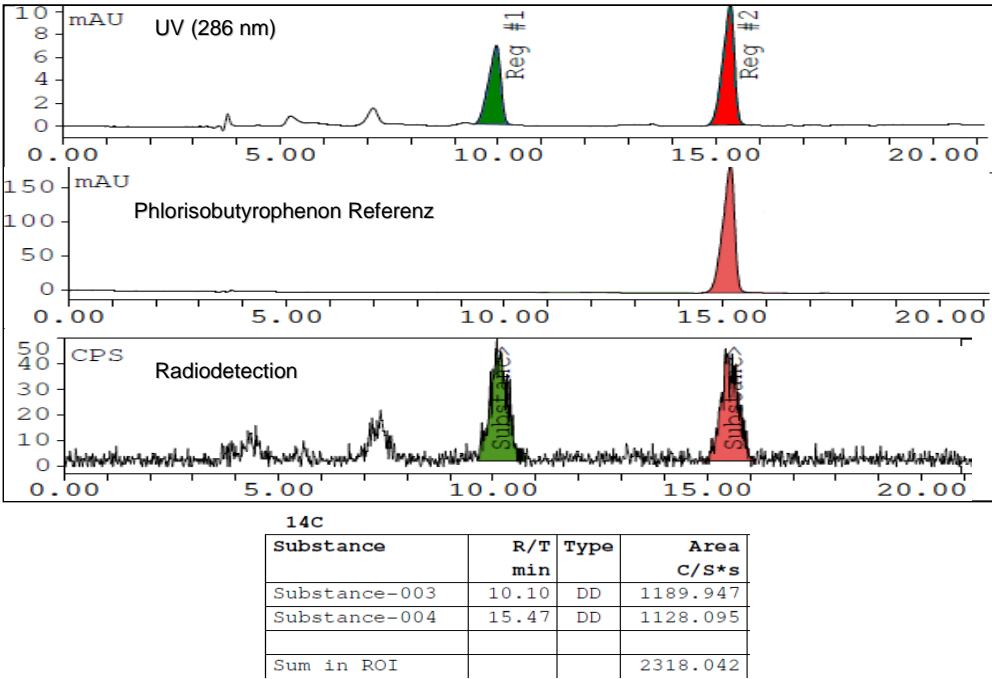


Abb. 4.22: Analyse von Enzymansätzen mit Isobutyryl-CoA und [2-<sup>14</sup>C] Malonyl-CoA

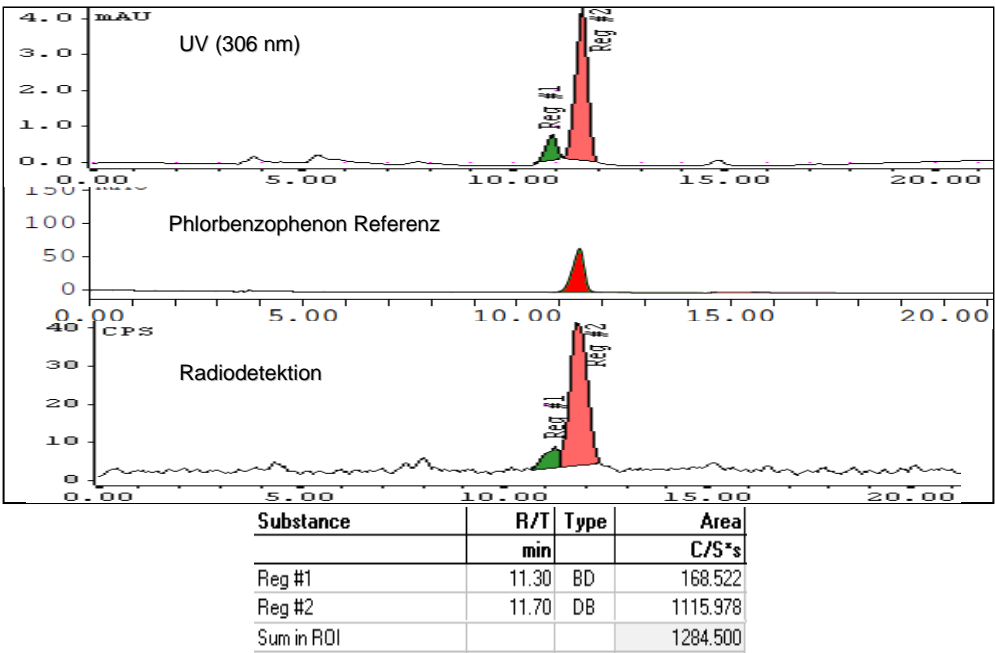


Abb. 4.23: Analyse von Enzymsätzen mit Benzoyl-CoA und [2-<sup>14</sup>C] Malonyl-CoA

Da sich als bevorzugte Substrate Isobutyryl-CoA und Benzoyl-CoA herausstellten, wurden für diese Starter die kinetischen Daten bestimmt. Das bevorzugte Substrat sollte einen niedrigeren  $K_m$ -Wert haben.

4.10.4 Enzymkinetik

Um ein Enzym zu charakterisieren, spielen neben Temperatur- und pH-Optima auch die kinetischen Größen eine wichtige Rolle. Eine dieser Größen ist die Michaelis-Konstante, die die Affinität des Enzyms zum Substrat beschreibt und wie folgt berechnet wird:

$v = (V_{max} * [S]) \div (K_m + [S])$ , wobei  $v$  = Reaktionsgeschwindigkeit,  $V_{max}$  = maximale Reaktionsgeschwindigkeit,  $[S]$  = Substratkonzentration und  $K_m$  = Michaelis-Konstante ist. Die Michaelis-Konstante bezeichnet die Substratkonzentration, bei der eine enzymatische Reaktion mit halbmaximaler Geschwindigkeit erfolgt. Dabei wird davon ausgegangen, dass die Substratkonzentration über den gesamten Inkubationszeitraum konstant ist. Dies ist experimentell bei Konzentrationen, die deutlich über dem  $K_m$ -Wert liegen, gewährleistet. Bei niedrigen Substratkonzentrationen ist aber darauf zu achten, dass die Werte nicht durch eine messbare Substratabnahme verfälscht werden. Daher sollte die Inkubation nicht zu lange erfolgen und die eingesetzte Enzymmenge nicht zu groß gewählt werden. Andererseits muss noch in ausreichendem Maß Produkt für die Detektion und

Quantifizierung gebildet werden. Die Einhaltung dieser Parameter kann die Bestimmung des  $K_m$ -Werts erschweren.

Hier erfolgten die Messungen in einem 250  $\mu$ l-Ansatz, wobei die Substratkonzentration von 0,2 bis etwa  $5 \times K_m$  anstieg. Das zweite Substrat lag jeweils in Sättigung vor. Die Proteinkonzentration war konstant (2  $\mu$ g). Der pH-Wert war 6,5 und die Temperatur 30 °C. Nach 10 min wurde das gebildete Produkt mit Ethylacetat ausgeschüttelt und die organische Phase bis zur Trockne eingeeengt. Die quantitative Analyse des in Methanol aufgenommenen Rests erfolgte mittels HPLC.

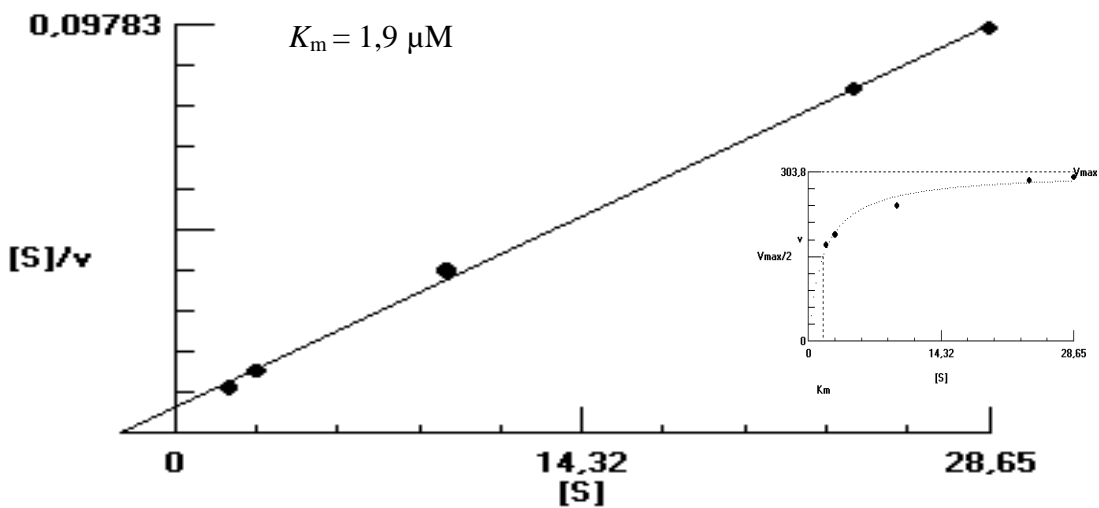
Die Bestimmung der Michaelis-Konstanten für die Substrate Isobutyryl-CoA und Benzoyl-CoA erwies sich aufgrund der niedrigen  $K_m$ -Werte als schwierig. Da aus dem Michaelis-Menten-Diagramm die wichtigen Messgrößen  $V_{max}$  und  $K_m$  nicht eindeutig hervorgehen, bedient man sich als Alternative des Hanes-Plots. Hierbei handelt es sich um eine linearisierte Darstellung des Michaelis-Menten-Diagramms. An der Abszisse wird die Substratkonzentration  $[S]$  aufgetragen. Die bei niedrigen Konzentrationen erhaltenen Messwerte üben einen geringen Einfluss auf die Steigung der Regressionsgeraden aus.

Für die beiden Substrate Isobutyryl-CoA und Benzoyl-CoA wurden die  $K_m$ -Werte sowie die  $K_{cat}$ - (Umsatzraten) und  $K_{cat}/K_m$ -Werte (katalytische Effizienzen) ermittelt.

#### ➤ Isobutyryl-CoA

Aus dem Hanes Plot ergab sich für Isobutyryl-CoA ein  $K_m$ -Wert von 1,9  $\mu$ M (Abb. 4.24).

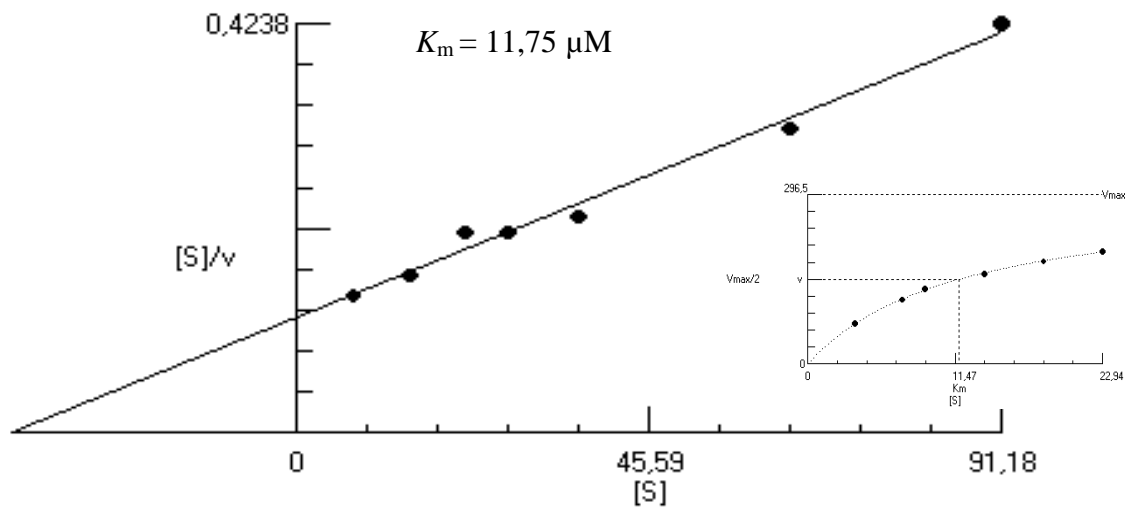
Der  $K_{cat}$ -Wert war  $1,56 \text{ min}^{-1}$ . Daraus errechnete sich dann ein  $K_{cat}/K_m$ -Wert von  $13684,2 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ .



**Abb. 4.24:** Bestimmung des  $K_m$ -Werts für Isobutyryl-CoA im Hanes-Plot, Inset zeigt die Michaelis-Menten-Kinetik

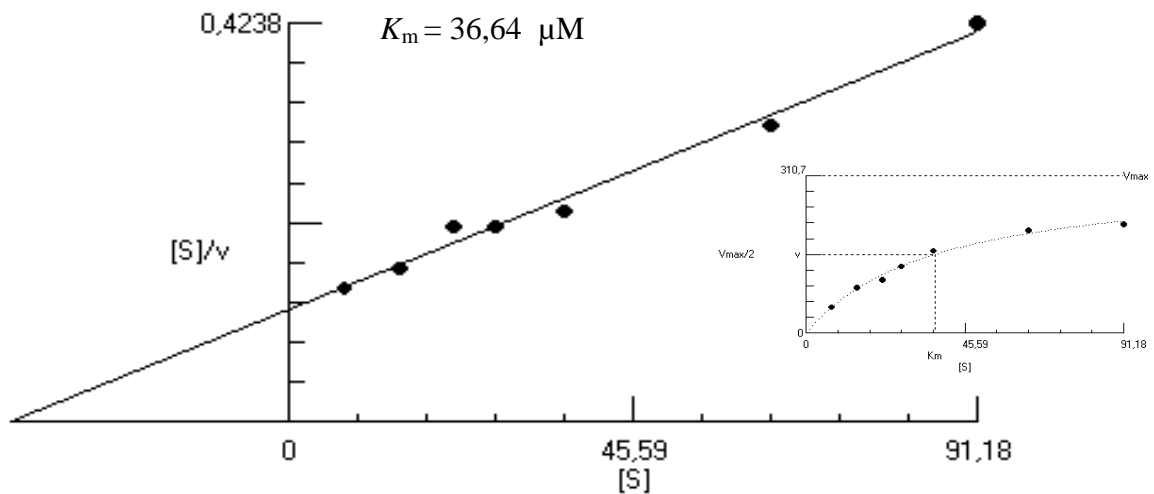
➤ **Benzoyl-CoA**

Aus dem Hanes Plot ergab sich für Benzoyl-CoA ein  $K_m$ -Wert von  $11,75 \mu\text{M}$  (Abb. 4.25). Der  $K_{cat}$ -Wert war  $1,5 \text{ min}^{-1}$ . Daraus errechnete sich dann ein  $K_{cat}/K_m$ -Wert von  $2127,65 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ .



**Abb. 4.25:** Bestimmung des  $K_m$ -Werts für Benzoyl-CoA im Hanes-Plot, Inset zeigt die Michaelis-Menten-Kinetik

Das bevorzugte Substrat hat einen niedrigeren  $K_m$ -Wert d.h nach der Bestimmung des  $K_m$ -Werts für die beiden Substrate ergab sich, dass Isobutyryl-CoA das bevorzugte Substrat des Enzyms ist. Deswegen wurde der  $K_m$ -Wert für Malonyl-CoA nur zusammen mit Isobutyryl-CoA ermittelt.



**Abb. 4.26:** Bestimmung des  $K_m$ -Werts für Malonyl-CoA im Hanes-Plot, Inset zeigt die Michaelis-Menten-Kinetik

Für Malonyl-CoA ergab sich aus dem Hanes-Plot ein  $K_m$ -Wert von 36,64  $\mu\text{M}$  (Abb. 4.26).

#### 4.11 Aktivitäten verschiedener BPS-Enzyme in Gegenwart von [2- $^{14}\text{C}$ ] Malonyl-CoA

Zum Vergleich mit HpBUS wurden verschiedene BPS untersucht, für die cDNAs aus der *Hypericum*-Gattung kloniert wurden:

BPS aus *H. androsaemum* (HaBPS; Liu et al., 2003),

BPS aus *H. calycinum* (HcBPS; Klingkauf, 2004),

BPS aus *H. perforatum* subsp. *angustifolium* (HpaBPS; Tocci, 2012),

BPS aus *H. sampsonii* (HsBPS; Huang et al., 2012).

Diese BPS Enzyme hatten als bevorzugtes Substrat Benzoyl-CoA, aber sie akzeptierten auch Isobutyryl-CoA bei niedrigerer Produktquantität. HpBUS bevorzugte am stärksten Isobutyryl-CoA. Dieses Enzym hatte eine Sequenz-Übereinstimmung zwischen 93 und 98% mit den anderen BPS (Tab. 4.10).

Um den Unterschied zwischen der HpBUS und den anderen BPS unter identischen experimentellen Bedingungen zu bestätigen, wurde die Substratspezifität dieser BPS mit [2- $^{14}\text{C}$ ] Malonyl-CoA erneut untersucht. Die folgende Substrate wurden benutzt: Benzoyl-CoA, 3-Hydroxybenzoyl-CoA, Isobutyryl-CoA, Isovaleryl-CoA und Butyryl-CoA. Die Inkubationen erfolgten bei pH 6,5 und 30 °C. Die Ergebnisse sind in Prozent-Aktivität präsentiert (Tab. 4.6 - 4.9).

**Tab. 4.6:** Substratspezifität der HcBPS in Gegenwart von [2-<sup>14</sup>C] Malonyl-CoA

	Benzoyl-CoA	3-Hydroxybenzoyl-CoA	Isobutyryl-CoA	Isovaleryl-CoA	Butyryl-CoA
Hauptprodukt (%)	100	61,1	10	8,74	2,12
Nebenprodukt (%)	70,97	11,6	12,0	86,15	92,35

**Tab. 4.7:** Substratspezifität der HaBPS in Gegenwart von [2-<sup>14</sup>C] Malonyl-CoA

	Benzoyl-CoA	3-Hydroxybenzoyl-CoA	Isobutyryl-CoA	Isovaleryl-CoA	Butyryl-CoA
Hauptprodukt (%)	100	64,7	9,6	33,74	25,74
Nebenprodukt (%)	36,0	0	17,74	56,77	74,32

**Tab. 4.8:** Substratspezifität der HsBPS in Gegenwart von [2-<sup>14</sup>C] Malonyl-CoA

	Benzoyl-CoA	3-Hydroxybenzoyl-CoA	Isobutyryl-CoA	Isovaleryl-CoA	Butyryl-CoA
Hauptprodukt (%)	100	80,85	0	9,15	1,65
Nebenprodukt (%)	90,76	21,77	26,15	36,8	376,3

**Tab. 4.9:** Substratspezifität der HpaBPS in Gegenwart von [2-<sup>14</sup>C] Malonyl-CoA

	Benzoyl-CoA	3-Hydroxybenzoyl-CoA	Isobutyryl-CoA	Isovaleryl-CoA	Butyryl-CoA
Hauptprodukt (%)	100	43,45	46,4	11,81	36,8
Nebenprodukt (%)	0	0	34,32	5,0	136

Die Ergebnisse mit [2-<sup>14</sup>C] Malonyl-CoA ähneln denen, die mit unmarkiertem Malonyl-CoA erhalten wurden.

**4.12 Mutagenese der HpBUS**

Alle untersuchten BPS bevorzugten als Starter-Substrat Benzoyl-CoA und hatten darüber hinaus noch hohe Aktivität mit dem zweiten aromatischen Starter, 3-Hydroxybenzoyl-CoA. Erwähnenswert ist, dass HpaBPS auch noch relativ hohe Aktivität mit Isobutyryl-CoA hatte. Im Gegensatz dazu zeigte HpBUS die höchsten Aktivitäten gleichermaßen mit Isobutyryl-CoA und Benzoyl-CoA, aber nur einen geringen Umsatz von 3-Hydroxybenzoyl-CoA. Das Enzym arbeitete auch relativ effizient mit den verschiedenen aliphatischen Starter-Substraten. Um Unterschiede zwischen den Sequenzen der HpBUS und der anderen BPS festzustellen, wurde ein Alignment durchgeführt. Es ergab, dass HpBUS – abgesehen



von den terminalen Bereichen - in drei Positionen abweicht, die in den anderen BPS hoch konserviert sind: Threonin-68, Isoleucin-176 und Threonin-277 (Abb. 4.27).

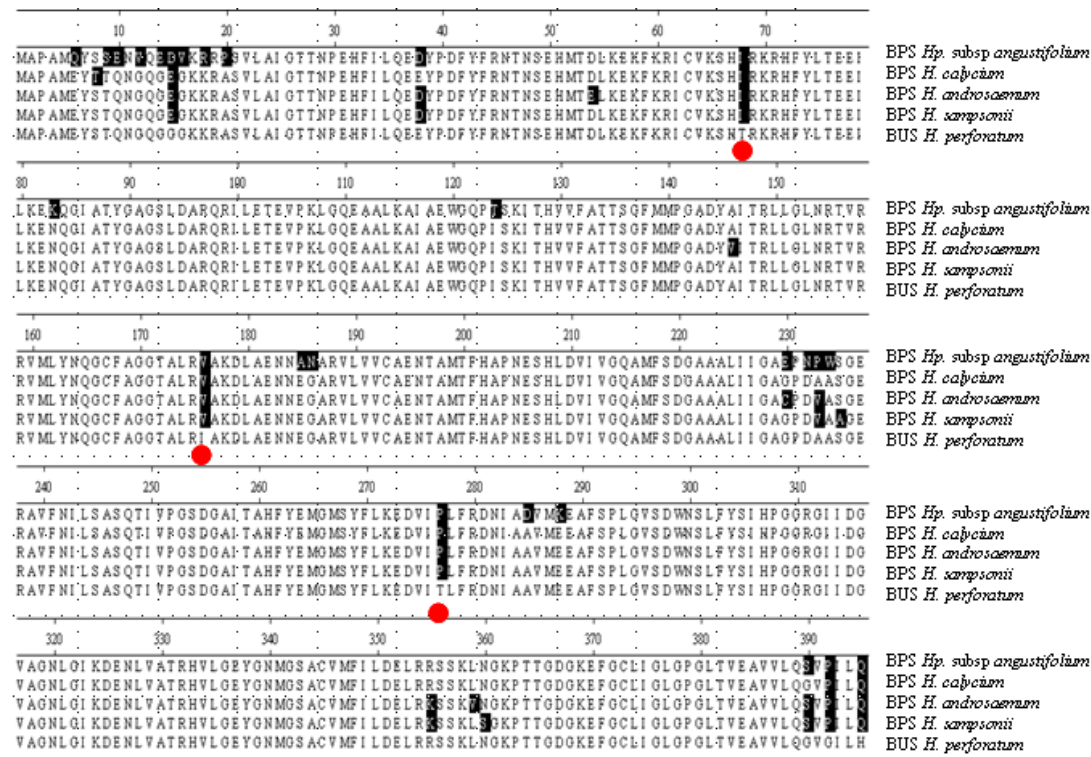


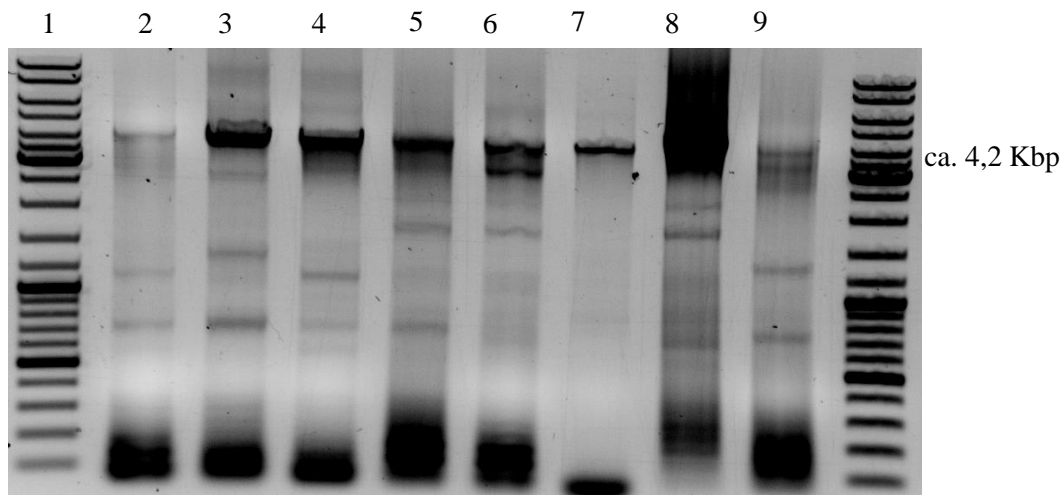
Abb. 4.27: Vergleich der Aminosäuren-Sequenzen von BPS aus *H. angustifolium*, *H. calycinum*, *H. androsaemum* und *H. sampsonii* sowie BUS aus *H. perforatum*

Tab. 4.10: Prozentuale Identität zwischen ausgewählten BPS und HpBUS auf Aminosäuren-Ebene

Identität (%)	1	2	3	4	5
1 BPS <i>Hp.subsp. angustifolium</i>		94,4	94,2	94,4	93,2
2 BPS <i>H. calycinum</i>			97,7	98,2	98,0
3 BPS <i>H. androsaemum</i>				98,5	96,2
4 BPS <i>H. sampsonii</i>					96,5
5 BUS <i>H. perforatum</i>					

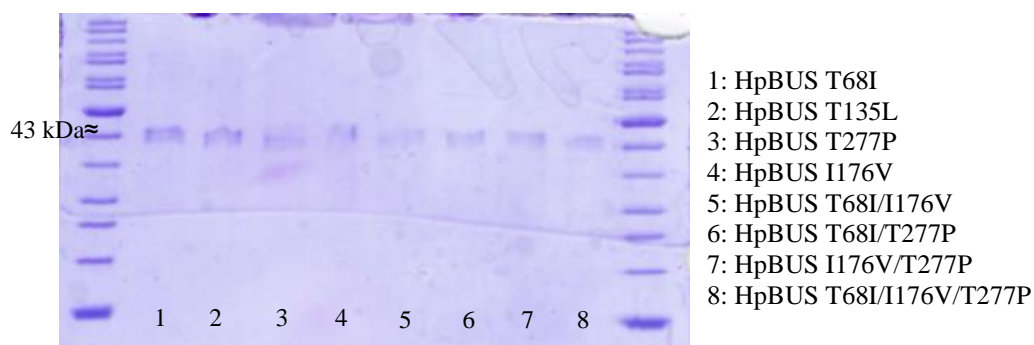
Um die Auswirkungen der abweichenden Aminosäuren in der HpBUS zu ergründen, wurden Mutationen dieser drei Reste in Richtung der anderen BPS durchgeführt. Die Mutationen wurden in der Form benannt, dass der erste Buchstabe die ursprüngliche Aminosäure angibt, die folgenden Ziffern die Position in der Wildtyp-HpBUS bezeichnen und der letzte Buchstabe die an dieser Stelle neu eingeführte Aminosäure nennt. Darüber hinaus wurden Einzel-, Doppel- und Tripel-Mutationen durchgeführt. Für die Enzym-Mutanten wurden Änderungen in der Substrat- und Produktspezifität ausgewiesen, detaillierter untersucht und vergleichend zur Wildtyp-HpBUS charakterisiert.

Alle hergestellten Plasmide wurden wie in Abb. 4.28 dargestellt auf ihre korrekte Größe untersucht, die ca. 4,2 Kbp betrug.



**Abb. 4.28:** Gel-Elektrophorese von Plasmiden mit mutierten HpBUS-Sequenzen (1: DNA-Leiter; 2: T68I; 3: T135L; 4: T277P; 5: I176V; 6: T68I/I176V; 7: T68I/T277P; 8: I176V/T277P; 9: T68I/I176V/T277P)

Nach der Aufreinigung der exprimierten Proteine mittels Affinitätschromatographie wurden die Enzyme auf ihre Reinheit durch ein SDS-Gel überprüft. Abb. 4.29 zeigt die Enzymmutanten nach ihrer Aufreinigung mit Ni-NTA-Agarose. Alle haben die gleiche Größe, circa 43 kDa, wie die gereinigte Wildtyp-HpBUS (Abb. 4.14).



**Abb. 4.29:** SDS-Gel mit jeweils 2 µg gereinigtem Protein der diversen HpBUS-Mutanten

### 4.13 Bestimmung der Enzymaktivitäten der HpBUS-Mutanten

Um die Auswirkungen von Einzel-, Doppel- und Tripel-Mutationen auf die Substrat- und Produktspezifität der HpBUS zu prüfen, wurden die erzeugten Enzym-Mutanten mit verschiedenen Starter-Substraten inkubiert und die Produktbildung qualitativ wie quantitativ analysiert.

4.13.1 Einzelmutationen der HpBUS in Richtung der anderen BPS

Die Änderung der polaren Aminosäure Threonin in der Position 68 zur unpolaren Aminosäure Isoleucin und der Austausch der Aminosäure Threonin in der Position 277 zur unpolaren Aminosäure Prolin ergaben keine signifikanten Veränderungen der Substratspezifität, erniedrigten aber die Aktivität im Vergleich zum Wildtyp deutlich (Tab. 4.11; Tab. 4.12).

Die Proteinausbeute der beiden Mutanten war 0,2 mg L<sup>-1</sup>. Die Enzyme verloren ihre Aktivität bei -20°C (mit 20 % Glycerin konserviert) innerhalb eines Tages nach Proteinexpression.

Tab.4.11: Auswirkung der Mutation T68I auf Spezifität und Aktivität

Substrat	Hauptprodukt pKat/mg	Nebenprodukt pKat/mg	Summe pKat/mg
Benzoyl-CoA (2)	105,1	2,24	107,34
3-Hydroxybenzoyl-CoA	29,6	3,8	33,4
Isobutyryl-CoA (1)	111,35	18,25	129,6
Isovaleryl-CoA	74,8	18,18	92,98
Butyryl-CoA	45,3	59,89	105,19
Hexanoyl-CoA	0	17,78	17,78
Octanoyl-CoA	0	4,5	4,5
p-Cumaroyl-CoA	0	0	0
Cinnamoyl-CoA	0	0	0
2-Hydroxybenzoyl-CoA	0	0	0
4-Hydroxybenzoyl-CoA	0	0	0
Acetyl-CoA	0	0	0

**Tabb.4.12:** Auswirkung der Mutation T277P auf Spezifität und Aktivität

Substrat	Hauptprodukt pKat/mg	Nebenprodukt pKat/mg	Summe pKat/mg
Benzoyl-CoA	188,6	7,84	196,44
3-Hydroxybenzoyl-CoA	32,34	4,77	37,11
Isobutyryl-CoA	186,84	62	248,84
Isovaleryl-CoA	90,4	74,45	164,85
Butyryl-CoA	35,6	160,3	195,9
Hexanoyl-CoA	5,5	96,86	102,36
Octanoyl-CoA	0	9,46	9,46
<i>p</i> -Cumaroyl-CoA	0	0	0
Cinnamoyl-CoA	0	0	0
2-Hydroxybenzoyl-CoA	0	0	0
4-Hydroxybenzoyl-CoA	0	0	0
Acetyl-CoA	0	0	0

Die Veränderung der Aminosäure Isoleucin in der Position 176 zur unpolaren Aminosäure Valin verursachte eine Erhöhung der Aktivität mit Isovaleryl-CoA. Diese Mutation ergab eine Phlorisovalerophenonsynthase (VPS) (Tab. 4.13). Das zweitbeste Starter-Substrat war Isobutyryl-CoA wie bei der VPS aus Hopfen (Okada et al., 2001). Der Unterschied zwischen diesen beiden Substraten ist nur eine Methylen-Gruppe. Die Aktivitäten mit Butyryl-CoA, Hexanoyl-CoA und 3-Hydroxybenzoyl-CoA waren ebenfalls erhöht. Die Ausbeute der Enzym-Mutante I176V war 1,4 mg L<sup>-1</sup> und sie verlor ihre Aktivität bei - 20°C innerhalb eines Tages nach der Proteinexpression.

**Tab. 4.13:** Auswirkung der Mutation I176V auf Spezifität und Aktivität

Substrat	Hauptprodukt pKat/mg	Nebenprodukt pKat/mg	Summe pKat/mg
Benzoyl-CoA	140,78	14	154,78
3-Hydroxybenzoyl-CoA	94,92	6	100,92
Isobutyryl-CoA (2)	177,6	56,4	234
Isovaleryl-CoA (1)	196,91	97,9	294,81
Butyryl-CoA	66,67	181,8	248,47
Hexanoyl-CoA	35	152,9	152,9
Octanoyl-CoA	0	22,14	22,14
<i>p</i> -Cumaroyl-CoA	0	0	0
Cinnamoyl-CoA	0	0	0
2-Hydroxybenzoyl-CoA	0	0	0
4-Hydroxybenzoyl-CoA	0	0	0
Acetyl-CoA	0	0	0

#### 4.13.2 Einzelmutation der HpBUS unabhängig von anderen BPS

Die Aminosäure Threonin in der Position 135 war in allen Sequenzen vorhanden. Klundt et al. (2009) hatten diese Aminosäure in HaBPS zu Leucin verändert. Diese Mutation ergab eine starke Veränderung der Produktspezifität. Es resultierte eine Phenylpyron-Synthase. Die gleiche Mutation wurde hier in HpBUS gemacht, aber die Mutante war inaktiv.

#### 4.13.3 Doppelmutationen der HpBUS in Richtung der anderen BPS

Drei Kombinationen von Doppel-Mutationen wurden durchgeführt und die Auswirkungen auf Spezifität und Aktivität geprüft.

❖ **T68I/T277P**: Die Veränderung gleichzeitig von Threonin in der Position 68 zur Isoleucin und in der Position 277 zu Prolin verursachte eine Reduzierung der Aktivität mit Benzoyl-CoA und eine Erhöhung der Aktivität mit Isovaleryl-CoA, Hexanoyl-CoA und 3-Hydroxybenzoyl-CoA, während die Aktivität mit Isobutyryl-CoA sich kaum veränderte und deshalb eine Isobutyrophenon-Synthase resultierte (Tab. 4.14).

❖ **T68I/I176V**: Diese Kombination verstärkte die Aktivität mit Isobutyryl-CoA, Butyryl-CoA, Hexanoyl-CoA und 3-Hydroxybenzoyl-CoA (Tab. 4.15). Es ergab sich wiederum eine Isobutyrophenon-Synthase.

❖ **T277P/I176V:** Diese Doppelmutante war eine Isovalerophenon-Synthase, deren Aktivität mit Butyryl-CoA, Hexanoyl-CoA und 3-Hydroxybenzoyl-CoA im Vergleich zum Wildtyp ebenfalls erhöht war (Tab. 4.16).

Die Ausbeute der drei Doppel-Mutanten war 2 mg L<sup>-1</sup> und sie waren aktiv nach einem Tag der Proteinexpression. Sie wurden mit 20 % Glycerin konserviert und bei -20°C gelagert.

**Tab. 4.14:** Auswirkung der Doppelmutation T68I/T277P auf Spezifität und Aktivität

Substrat	Hauptprodukt pKat/mg	Nebenprodukt pKat/mg	Summe pKat/mg
Benzoyl-CoA	200,6	25,8	226,4
3-Hydroxybenzoyl-CoA	104,68	6	110,68
Isobutyryl-CoA (1)	328,1	91,92	420,02
Isovaleryl-CoA (2)	291,86	83,93	375,79
Butyryl-CoA	212,07	176,9	388,97
Hexanoyl-CoA	56,99	105,1	162,09
Octanoyl-CoA	0	11,36	11,36
<i>p</i> -Cumaroyl-CoA	0	0	0
Cinnamoyl-CoA	0	0	0
2-Hydroxybenzoyl-CoA	0	0	0
4-Hydroxybenzoyl-CoA	0	0	0
Acetyl-CoA	0	0	0

**Tab. 4.15:** Auswirkung der Doppelmutation T68I/I176V auf Spezifität und Aktivität

Substrat	Hauptprodukt pKat/mg	Nebenprodukt pKat/mg	Summe pKat/mg
Benzoyl-CoA (2)	305,11	20,5	325,61
3-Hydroxybenzoyl-CoA	166,52	10,04	176,56
Isobutyryl-CoA (1)	369,03	101	470,03
Isovaleryl-CoA	163,82	67,14	230,96
Butyryl-CoA	114,75	231,5	346,25
Hexanoyl-CoA	41,57	194,8	236,37
Octanoyl-CoA	0	93,56	93,56
<i>p</i> -Cumaroyl-CoA	0	0	0
Cinnamoyl-CoA	0	0	0
2-Hydroxybenzoyl-CoA	0	0	0
4-Hydroxybenzoyl-CoA	0	0	0
Acetyl-CoA	0	0	0

**Tab. 4.16:** Auswirkung der Doppelmutation T277P/I176V auf Spezifität und Aktivität

Substrat	Hauptprodukt pKat/mg	Nebenprodukt pKat/mg	Summe pKat/mg
Benzoyl-CoA (2)	306,4	30	336,4
3-Hydroxybenzoyl-CoA	97,22	6,5	103,72
Isobutyryl-CoA	267,9	63,93	331,83
Isovaleryl-CoA (1)	358,91	158	516,91
Butyryl-CoA	116,73	265,6	382,33
Hexanoyl-CoA	34	90,89	124,89
Octanoyl-CoA	0	9	9
<i>p</i> -Cumaroyl-CoA	0	0	0

Cinnamoyl-CoA	0	0	0
2-Hydroxybenzoyl-CoA	0	0	0
4-Hydroxybenzoyl-CoA	0	0	0
Acetyl-CoA	0	0	0

4.13.4 Tripel-Mutation der HpBUS in Richtung der anderen BPS

Es stellte sich die Frage, ob die HpBUS in eine BPS überföhrbar ist. Daföür wurde eine Tripel-Mutation durchgeföhrt. Die resultierende Mutante ergab eine BPS, deren Aktivität mit Benzoyl-CoA und 3-Hydroxybenzoyl-CoA CoA im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöht war (Tab. 4.17). Auffällig war allerdings auch ein stark erhöhter Umsatz von Butyryl-CoA.

Die Ausbeute der Tripel-Mutante war 3 mg L<sup>-1</sup> und sie behielt ihre Aktivität bei -20°C nach einem Tag der Proteinexpression. Lagerung erfolgt mit 20 % Glycerin.

Tab. 4.17: Auswirkung der Tripel-Mutation auf Spezifität und Aktivität

Substrat	Hauptprodukt pKat/mg	Nebenprodukt pKat/mg	Summe pKat/mg
Benzoyl-CoA (1)	442,6	38,34	480,94
3-Hydroxybenzoyl-CoA	179,63	8,81	188,44
Isobutyryl-CoA (2)	198,6	39,85	238,45
Isovaleryl-CoA	131,9	16,84	148,74
Butyryl-CoA	152,83	276,3	429,13
Hexanoyl-CoA	50,34	280,3	330,64
Octanoyl-CoA	0	256,4	256,4
p-Cumaroyl-CoA	0	0	0
Cinnamoyl-CoA	0	0	0
2-Hydroxybenzoyl-CoA	0	0	0
4-Hydroxybenzoyl-CoA	0	0	0
Acetyl-CoA	0	0	0



4.14 Charakterisierung der Doppel-Mutante I176V/T277P

Die Substratspezifität wurde in 4.13.3 bestimmt. Das bevorzugte Substrat war Isovaleryl-CoA, mit dem sich Phlorisovalerophenon als Hauptprodukt und 4-Hydroxy-6-isobutylpyran-2-on als Nebenprodukt ergaben.

4.14.1 Bestimmung von pH- und Temperaturoptimum sowie Zeitabhängigkeit

Die maximale Enzymaktivität der Doppel-Mutante wurde bei einem pH-Wert von 6,5 beobachtet (Abb. 4.30). Das Temperatur-Optimum lag bei 30 °C (Abb. 4.31). Die Produktbildung war über 5 min linear (Abb. 4.32). Diese Daten entsprechen den Resultaten für die Wildtyp-HpBUS. Die Produktmengen wurden mittels HPLC-DAD ermittelt.

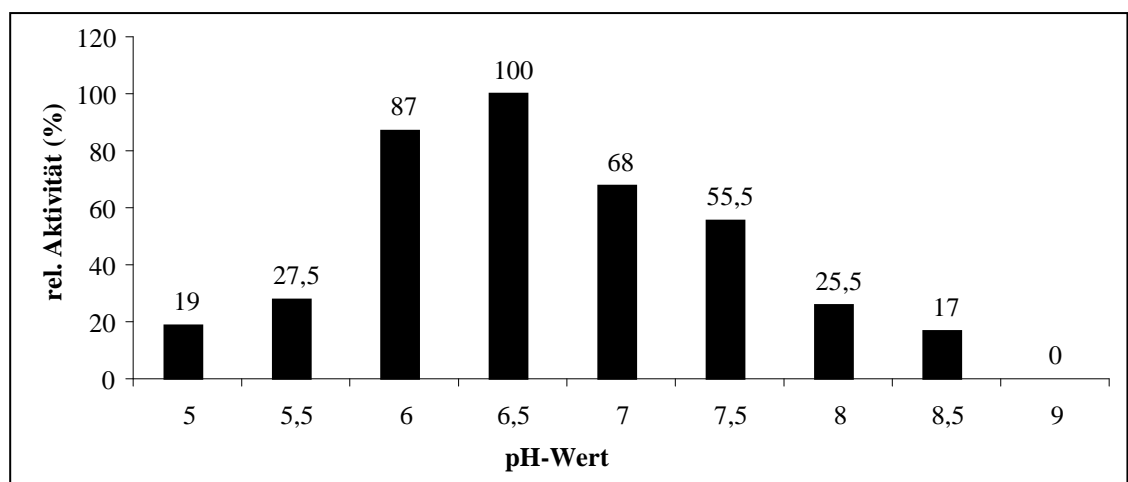


Abb. 4.30: pH-Optimum der Doppel-Mutante I176V/T277P

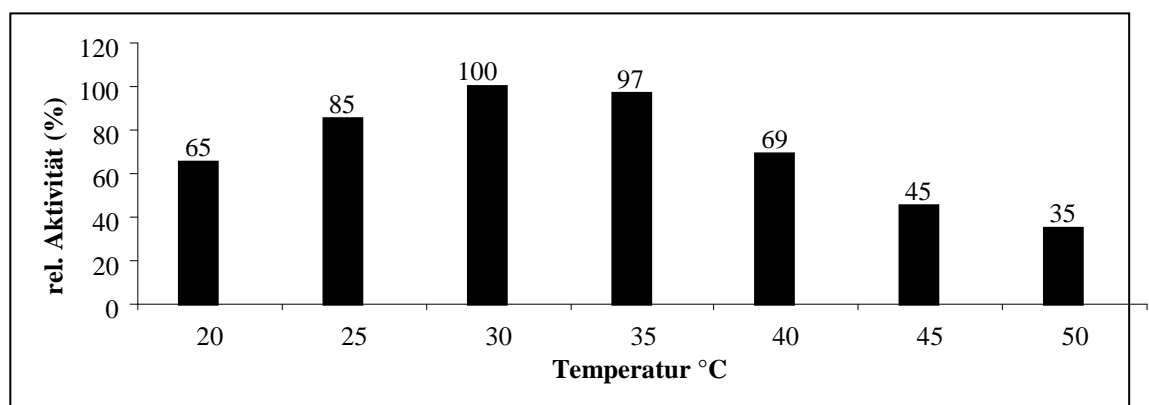


Abb. 4.31: Temperaturoptimum der Doppel-Mutante I176V/T277P

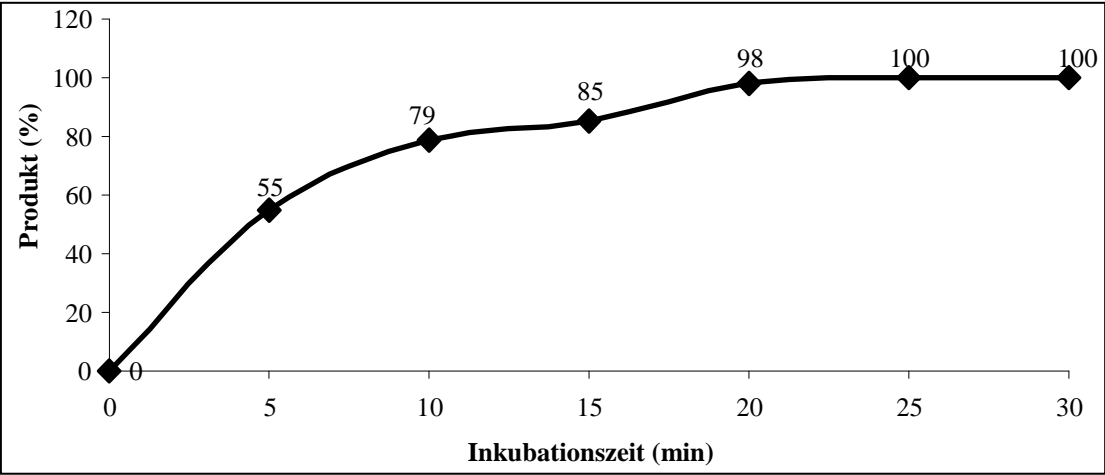


Abb.4.32: Zeitabhängigkeit der Aktivität der Doppel-Mutante I176V/T277P

4.14.2 Enzymkinetik

Für das bevorzugte Starter-Substrat Isovaleryl-CoA und den Kettenverlängerer Malonyl-CoA wurden die  $K_m$ ,  $K_{cat}$  und  $K_{cat}/K_m$ -Werte ermittelt.

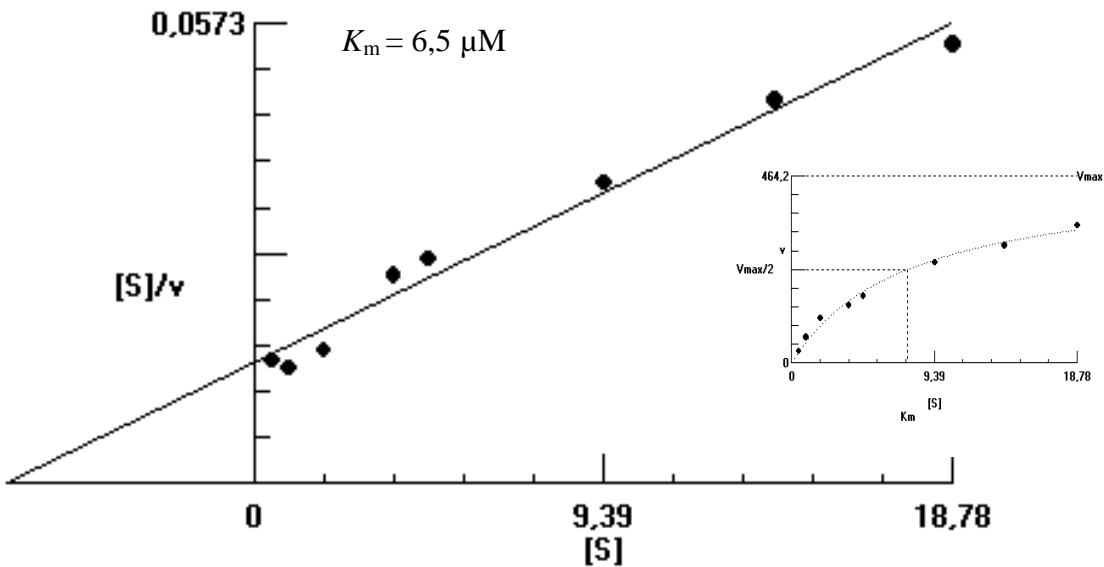
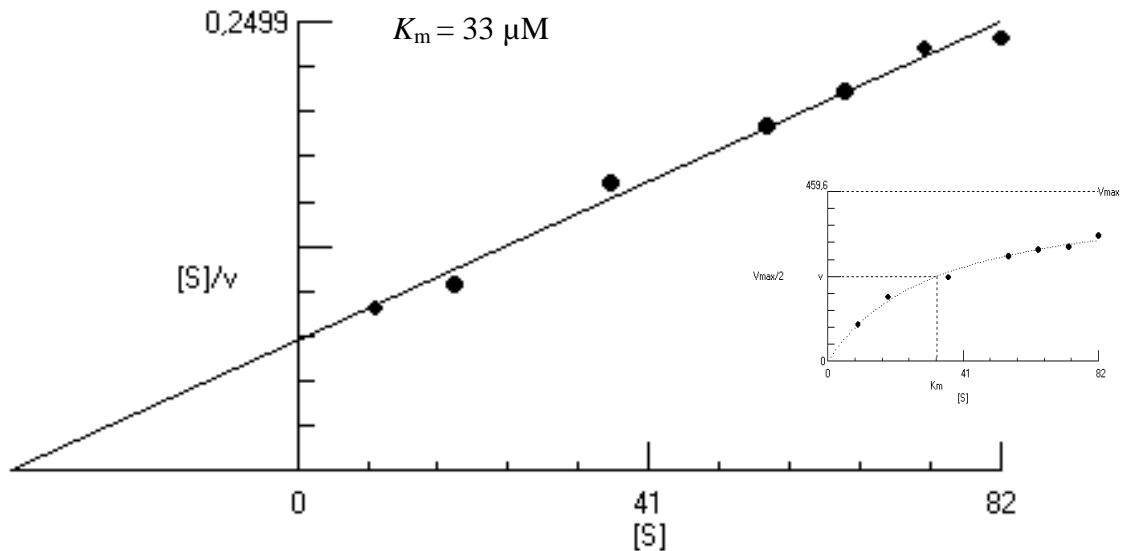


Abb. 4.33: Bestimmung des  $K_m$ -Werts für Isovaleryl-CoA im Hanes-Plot, Inserat zeigte die Michaelis-Menten-Kinetik

Aus dem Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der Abszisse ergab sich für Isovaleryl-CoA im Hanes-Plot ein  $K_m$ -Wert von  $6,5 \mu M$  (Abb. 4.33). Der  $K_{cat}$  -Wert war  $2,2 \text{ min}^{-1}$ . Daraus errechnete sich ein  $K_{cat}/K_m$ -Wert von  $5692,3 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ .



**Abb. 4.34:** Bestimmung des  $K_m$ -Werts für Malonyl-CoA im Hanes-Plot, Inset zeigt die Michaelis-Menten-Kinetik

Für Malonyl-CoA ergab sich nach Hanes ein  $K_m$ -Wert von  $33 \mu\text{M}$  (Abb. 4.34).

## 4.15 Charakterisierung der Tripel-Mutante

Die Substratspezifität wurde in 4.13.4 bestimmt. Die Tripel-Mutante hatte die höchste Aktivität mit Benzoyl-CoA.

### 4.15.1 Bestimmung des pH- und Temperaturoptimums sowie der Zeitabhängigkeit

Die maximale Enzymaktivität der Tripel-Mutante wurde bei einem pH-Wert von 6,5-7,0 beobachtet (Abb. 4.35). Das Temperatur-Optimum lag bei  $35^\circ\text{C}$  (Abb. 4.36). Die Produktbildung war über 5 min linear (Abb. 4.37). Die Produktmengen wurden mittels HPLC-DAD ermittelt.

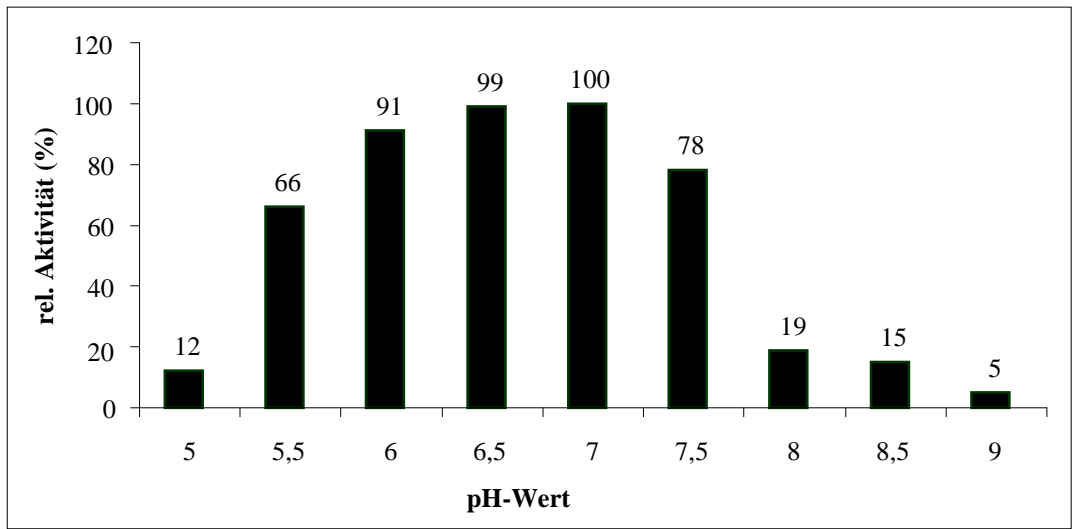


Abb. 4.35: pH-Optimum der Tripel-Mutante

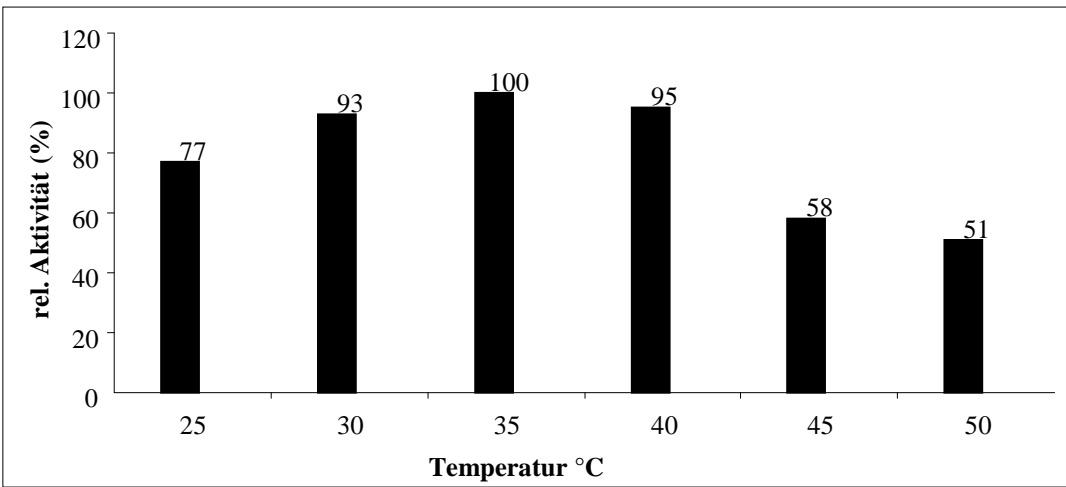


Abb. 4.36: Temperaturoptimum der Tripel-Mutante

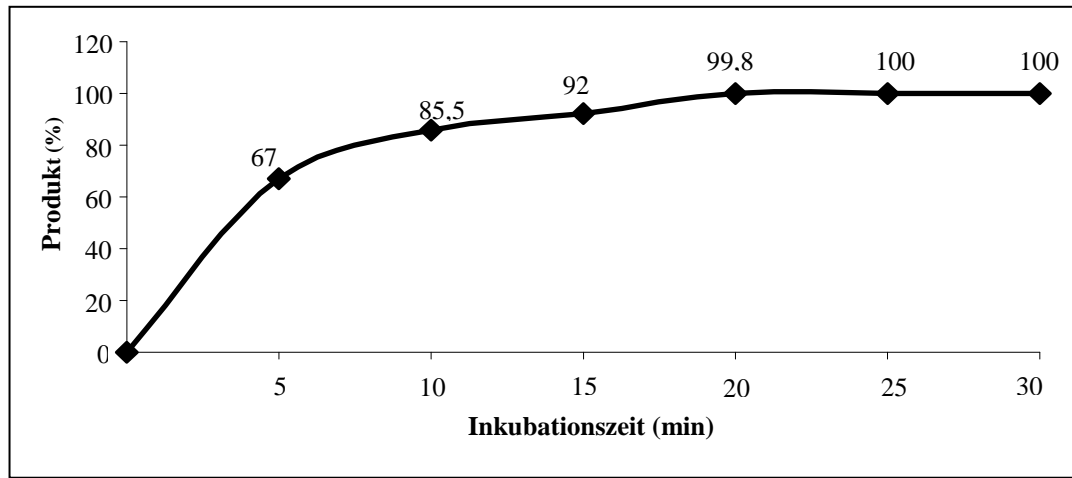
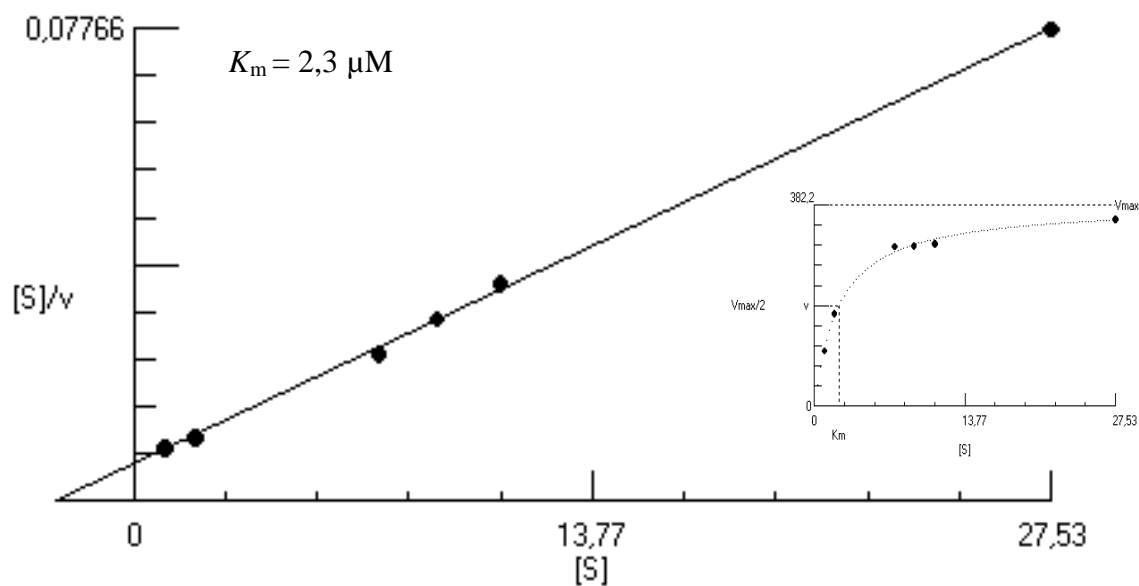


Abb.4.37: Zeitabhängigkeit der Aktivität der Tripel-Mutante

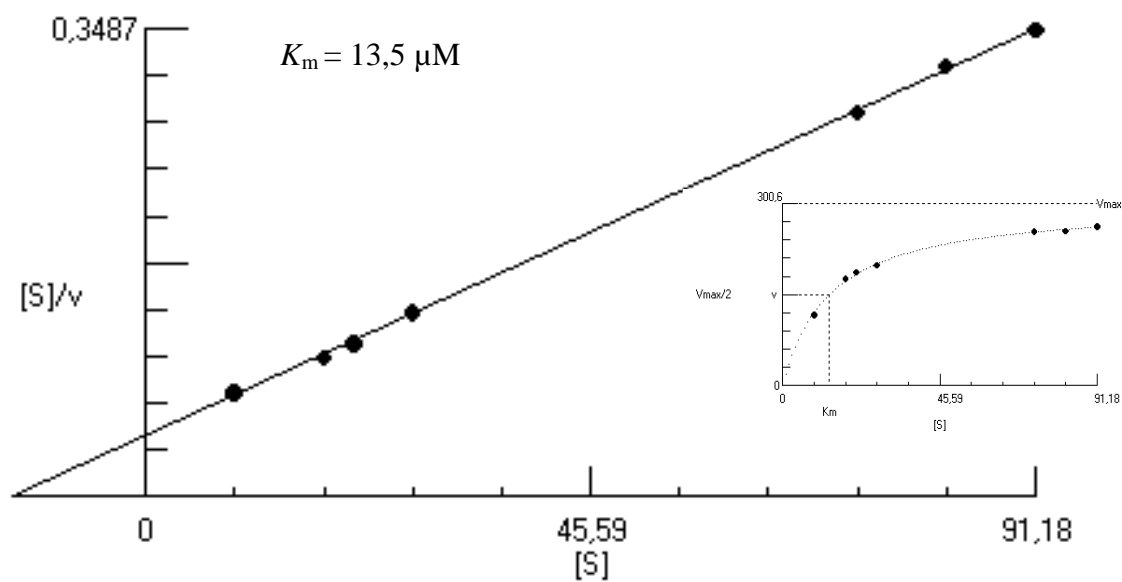
4.15.2 Enzymkinetik

Für das bevorzugte Starter-Substrat Benzoyl-CoA und den Kettenverlängerer Malonyl-CoA wurden die  $K_m$ ,  $K_{cat}$  und  $K_{cat} / K_m$  -Werte ermittelt.



**Abb. 4.38:** Bestimmung des  $K_m$ -Werts für Benzoyl-CoA im Hanes-Plot, Inset zeigt die Michaelis-Menten-Kinetik

Für Benzoyl-CoA ergab sich nach Hanes ein  $K_m$ -Wert von  $2,3 \mu\text{M}$  (Abb. 4.38). Der  $K_{cat}$ -Wert war  $1,92 \text{ min}^{-1}$ . Daraus errechnete sich ein  $K_{cat}/K_m$  -Wert von  $13913,0 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ .



**Abb. 4.39:** Bestimmung des  $K_m$ -Werts für Malonyl-CoA im Hanes-Plot, Inset zeigt die Michaelis-Menten-Kinetik

Für Malonyl-CoA ergab sich nach Hanes ein  $K_m$ -Wert von 13,5  $\mu\text{M}$  (Abb. 4.39).

4.16 Zusammenfassung der kinetischen Daten

In Tabelle 4.18 sind die kinetischen Eigenschaften des HpBUS-Wildtyps und der zwei Enzym-Mutanten zusammengestellt.

Tab. 4.18: Kinetische Eigenschaften des HpBUS-Wildtyps und der zwei Enzym-Mutanten

Substrate	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$K_{cat}/K_m$ ( $\text{M}^{-1}.\text{sec}^{-1}$ )	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ ) von Malonyl-CoA
Isobutyryl-CoA(Wild-Typ)	1,9	1,56	13684,2	36,6
Benzoyl-CoA (Wild-Typ)	11,75	1,5	2127,7	-----
Isovaleryl-CoA (Doppel-Mutant VPS)	6,5	2,2	5692,3	33,0
Benzoyl-CoA (Tripel-Mutant BPS)	2,3	1,92	13913,0	13,5

4.17 Identifizierung der gebildeten Produkte mit Hilfe der LC/MS

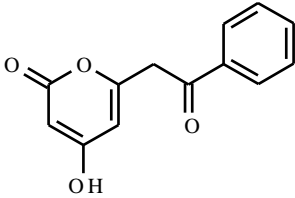
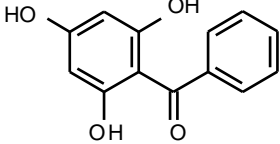
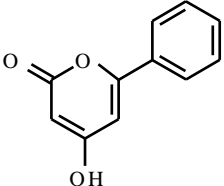
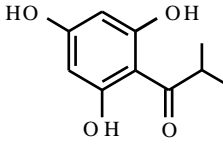
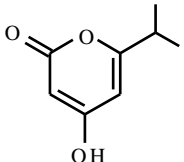
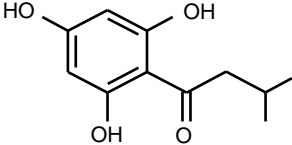
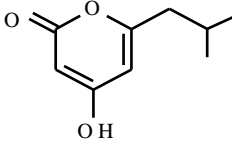
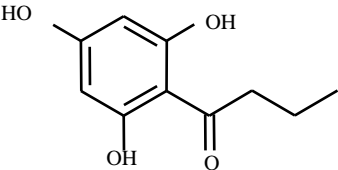
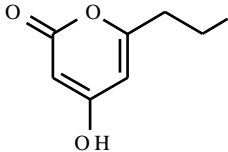
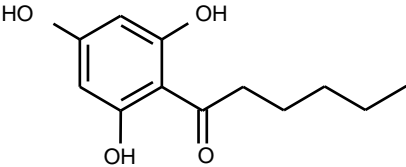
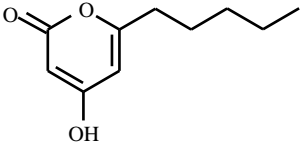
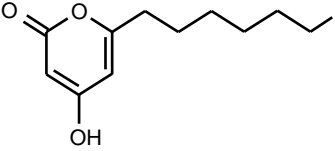
Mit jedem Starter-Substrat ergab sich ein Haupt- und ein Nebenprodukt. Um diese Produkte zu identifizieren wurde eine LC-MS durchgeführt. Als Enzym diente die Tripel-Mutante, die mit folgenden Substraten inkubiert wurde: Benzoyl-CoA, Isobutyryl-CoA, Isovaleryl-CoA, Butyryl-CoA, Hexanoyl-CoA und Octanoyl-CoA. Es fehlte nur eine Inkubation mit 3-Hydroxybenzoyl-CoA, da diese Produkte bereits von Klundt et al. (2009) identifiziert wurden: ein Phloroglucinol-Typ (2,3',4,6-Tetrahydroxybenzophenon) und ein Triketid-Lakton-Typ (4-Hydroxy-6-(3-hydroxy)-phenylpyran-2-on).

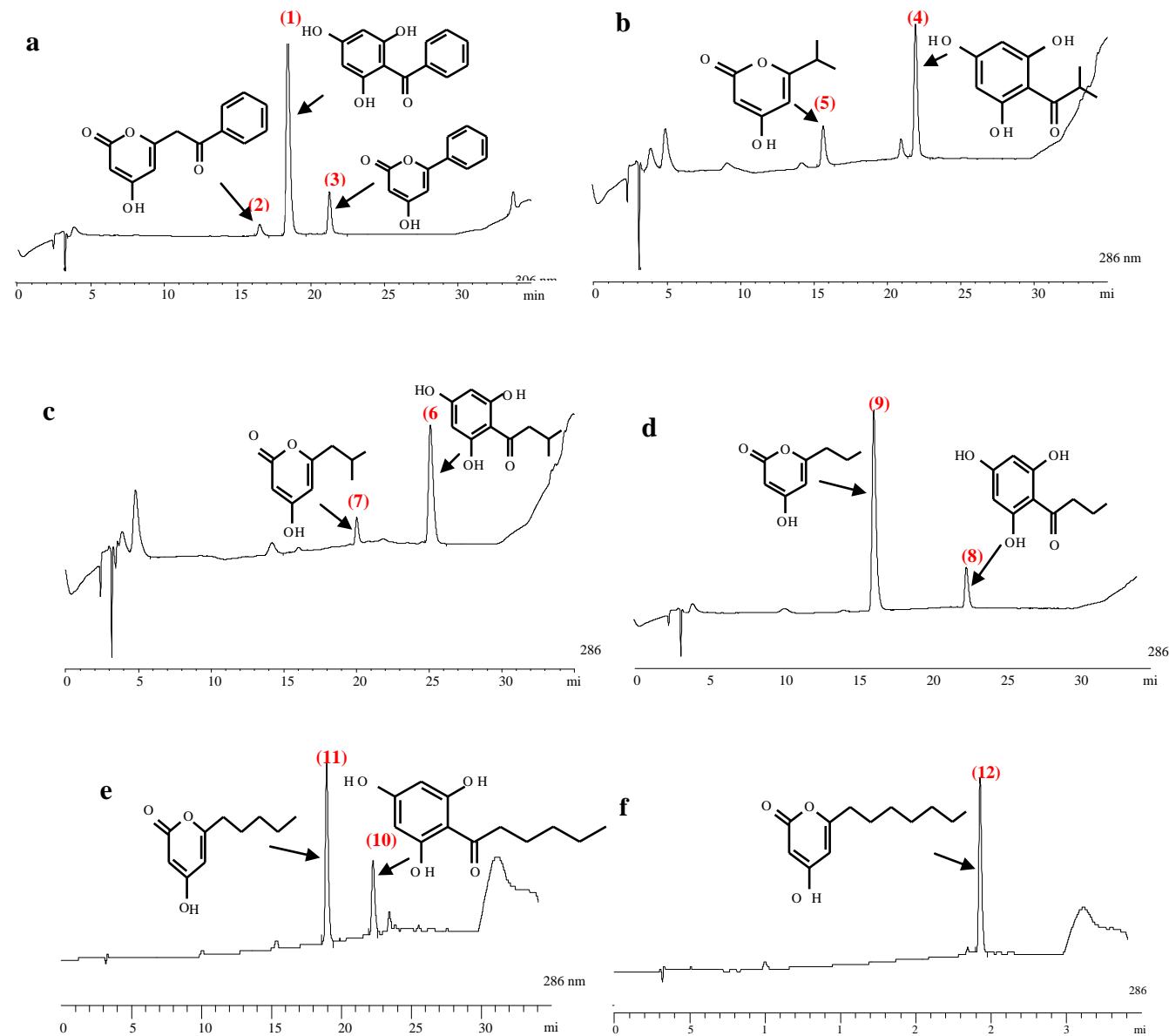
Generell wird das Hauptprodukt nach der Kondensation von drei Molekülen Malonyl-CoA mit einem Molekül des Starter-Substrats gebildet. Es ergibt sich ein Phloroglucinol-Typ (Tetraketid). Das Nebenprodukt resultiert aus der Reaktion von zwei Molekülen Malonyl-CoA mit einem Molekül des Starter-Substrats. Es ergibt sich ein Triketid-Lakton-Typ.

Die Inkubation der BPS mit Benzoyl-CoA ergab zwei Nebenprodukte, einen Triketid-Lakton-Typ und einen Tetraketid-Lakton-Typ, die von Nualkaew et al. (2012) identifiziert wurden.

Die LC-MS Chromtogramme sind in Anhang präsentiert. Die Identifizierungen sind in Tabelle 4.19 und Abb. 4.40 zusammengefasst.

Tab. 4.19: Identifizierung der gebildeten Produkte

Substrat	Tetraketid Lakton Typ	Phloroglucinol Typ	Triketid Lakton Typ
<b>Benzoyl-CoA</b> (a)	  m/z 231 [M+H] <sup>+</sup> (2) (Nualkaew et al., 2012)	  m/z 231 [M+H] <sup>+</sup> (1)	  m/z 189 [M+H] <sup>+</sup> (3)
<b>Isobutyryl-CoA</b> (b)		  m/z 197 [M+H] <sup>+</sup> (4)	  m/z 155 [M+H] <sup>+</sup> (5)
<b>Isovaleryl-CoA</b> (c)		  m/z 211 [M+H] <sup>+</sup> (6)	  m/z 169 [M+H] <sup>+</sup> (7)
<b>Butyryl-CoA</b> (d)		  m/z 196 [M+H] <sup>+</sup> (8)	  m/z 155 [M+H] <sup>+</sup> (9)
<b>Hexanoyl-CoA</b> (e)		  m/z 255 [M+H] <sup>+</sup> (10)	  m/z 183 [M+H] <sup>+</sup> (11)
<b>Octanoyl-CoA</b> (f)			  m/z 211 [M+H] <sup>+</sup> (12)



**Abb. 4.40:** HPLC-Chromatogramme der Produkte der Tripelmutante mit verschiedenen Starter-Substraten: Benzoyl-CoA (a); Isobutyryl-CoA (b); Isovaleryl-CoA (c); Butyryl-CoA (d); Hexanoyl-CoA (e) und Octanoyl-CoA (f)

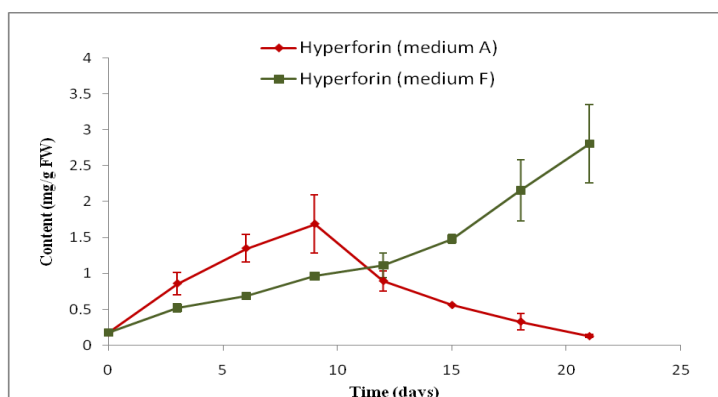


## 4.18 *in situ* Hybridisierung (ISH)

### 4.18.1 ISH von HpBUS- und HpaBPS-Transkripten in *H. perforatum*-Sprosskulturen

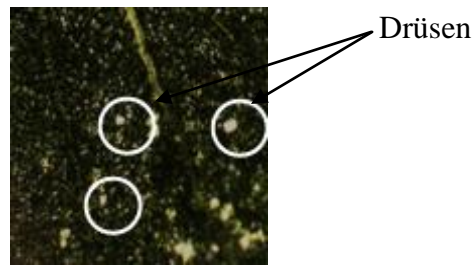
Da die HpBUS auf Grund ähnlicher Aktivitäten mit Benzoyl-CoA und Isobutyryl-CoA nicht eindeutig als BUS oder BPS einzustufen war, sollte die Zelltyp-spezifische Expression mittels ISH untersucht werden. Zur vergleichenden Untersuchung wurde die HpaBPS einbezogen, die immerhin noch 46% relative Aktivität mit Isobutyryl-CoA zeigt. Die ISH erlaubt die Lokalisierung der HpBUS- und HpaBPS-Transkripte mit hoher Sensitivität und Spezifität.

*H. perforatum*-Sprosskulturen wurden als Matrice verwendet, da in ihnen Hyperforin detektiert wurde (Charchoglyan et al., 2007). Von Dukovčić (2012) wurden zwei neue Medien (A, F) eingesetzt, in denen mehr Hyperforin gebildet wird. Das Medium F enthielt Myo-Inositol, weniger Vitamine aber keine Hormone und der Hyperforin-Gehalt stieg darin mehr oder weniger kontinuierlich an. Im Gegensatz dazu spielte das zweite Medium A, in dem Hormone, Myo-Inositol und mehr Vitamine vorhanden sind, die Rolle einer Elizitierung. Der Hyperforin-Gehalt stieg schneller an und erreichte das Maximum nach 9 Tagen, danach aber nahm die Hyperforin-Bildung schnell ab (Abb. 4.41).



**Abb. 4.41:** Hyperforin-Bildung auf zwei verschiedenen Medien (Dukovčić, 2012)

Die makroskopische Analyse zeigte, dass die schizogenen Drüsen sowohl bei Medium A als auch bei Medium F vorhanden sind (Abb. 4.42).



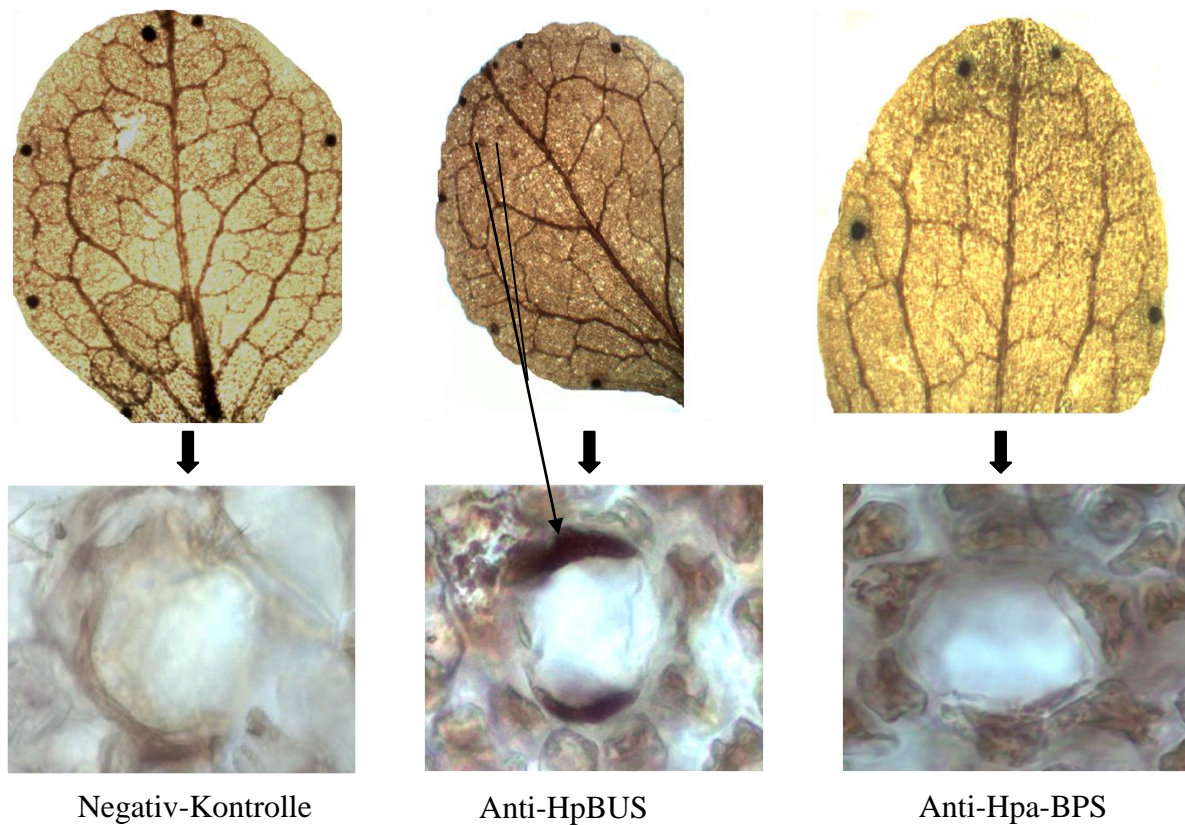
**Abb. 4.42:** Drüsen in Sprosskultur-Blättern auf Medium F (Dukovčić, 2012)

Für die ISH wurden die Sprosskulturen, die auf Medium F gewachsen waren, auf Medium A transferiert und nach dem dritten Tage kultiviert.

Die ISH wurde von zwei unabhängigen Forschergruppen entwickelt (John et al., 1969; Pardue und Gall, 1969). Bei der Hybridisierung bildet sich eine Doppelhelix aufgrund der Prinzipien der komplementären Basenpaarung. Mit Hilfe einer Sonde, einem genau definierten, künstlich hergestellten und markierten, kurzen DNA-Stück (Oligonukleotid) lassen sich komplementäre einzelsträngig vorliegende Nukleinsäuresequenzen im Gewebe oder innerhalb einer Zelle vor Ort („*in-situ*“) nachweisen. Digoxigenin-markierte Ribosonden gegen HpBUS- und HpaBPS-Transkripte wurden unter Verwendung des „*mirVana Probe Construction Kit*“ vorbereitet. Bei der ISH werden als Sonden Oligonukleotide mit einer Länge von circa 31 bp verwendet. Mit zunehmender Länge der Sonde erhöht sich ihre Spezifität, allerdings sinkt gleichzeitig ihre Penetrationsfähigkeit durch die Zellwand der Gewebe (Moter und Göbel, 2000).

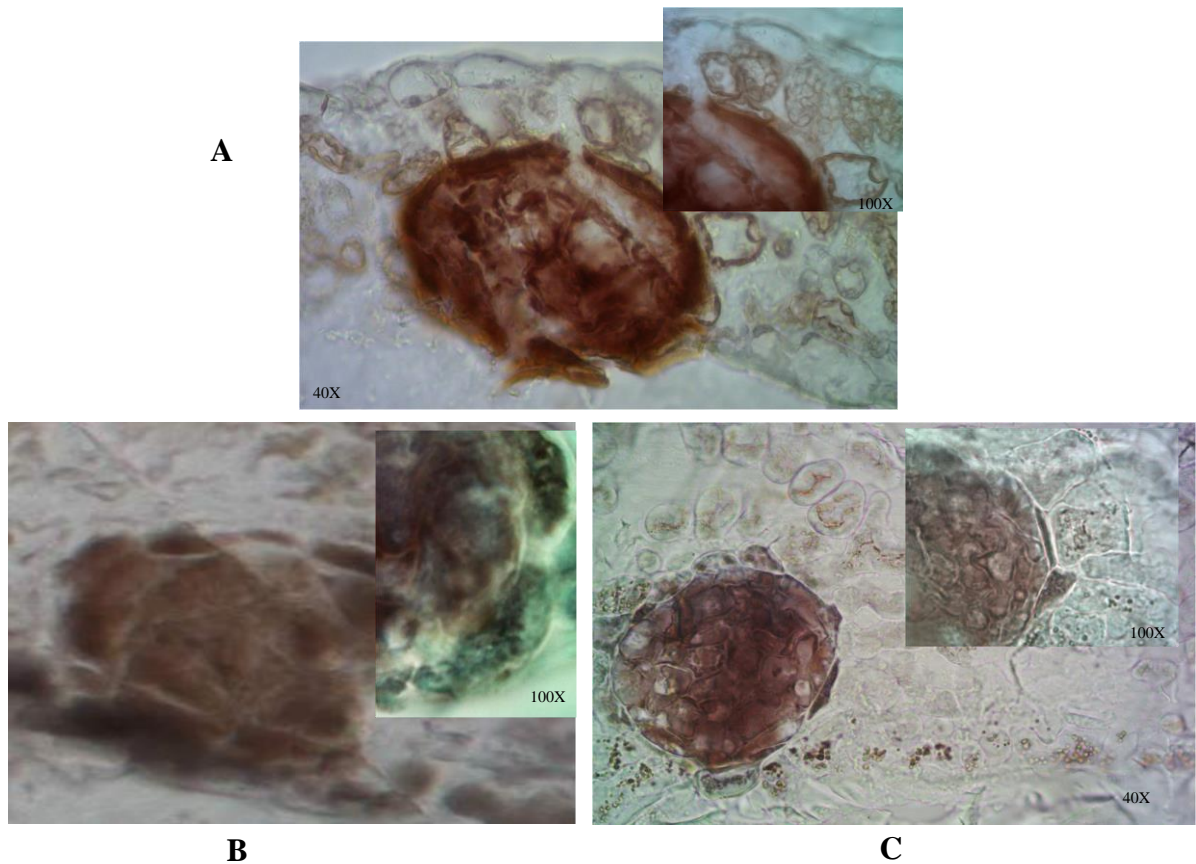
Die Signale wurden mit Antidigoxigenin-Antikörper, der mit alkalischer Phosphatase konjugiert war, nachgewiesen. Die Proben wurden unter dem Mikroskop (Axiostart, Zeiss) analysiert und mit einer Digitalkamera (dhs MicroCam 5.0) fotografiert.

Zunächst zeigte eine makroskopische Analyse, dass das HpBUS-Transkript vornehmlich im apikalen Teil der Blätter vorkam. Es gab auch eine Markierung in den Drüsen. Im Gegensatz dazu wurde das HpaBPS-Transkript sehr schwach im Blatt beobachtet und nicht in den Drüsen (Abb. 4.43).



**Abb. 4.43:** Makroskopische Analyse von Blättern nach ISH (whole mount ISH) sowie mikroskopische Analyse von schizogenen Drüsen

Um die präzise Lokalisierung der HpBUS- und HpaBPS-Transkripte zu überprüfen, wurden die Blätter in Harz eingebettet und Dünnschnitte angefertigt. Beide Transkripte wurden nicht in den schwarzen Zellaggregaten beobachtet (Abb. 4.44).

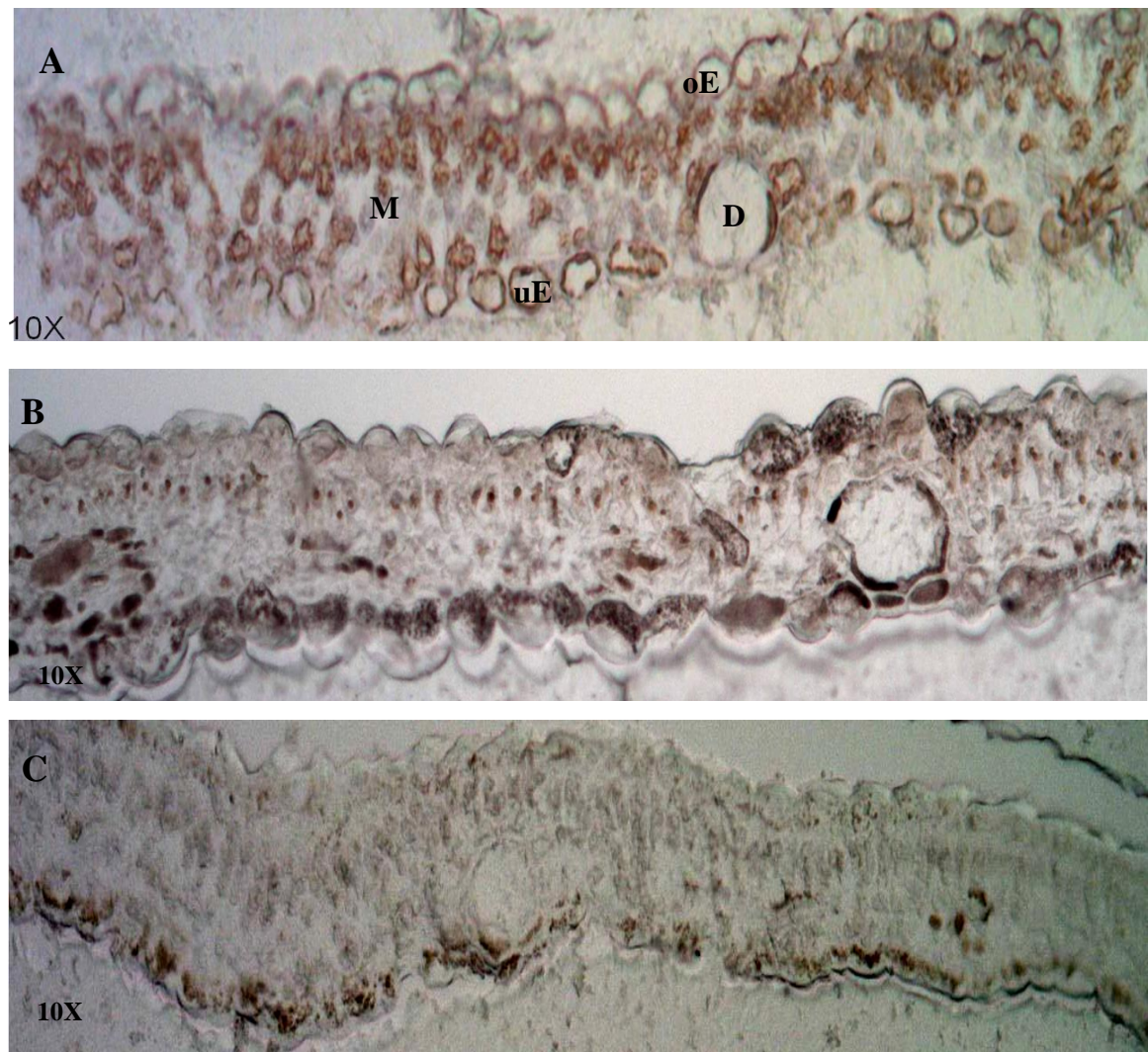


**Abb. 4.44:** Schwarze Zellaggregate nach ISH. A: Negativ-Kontrolle; B: Anti-HpBUS; C: Anti-HpaBPS

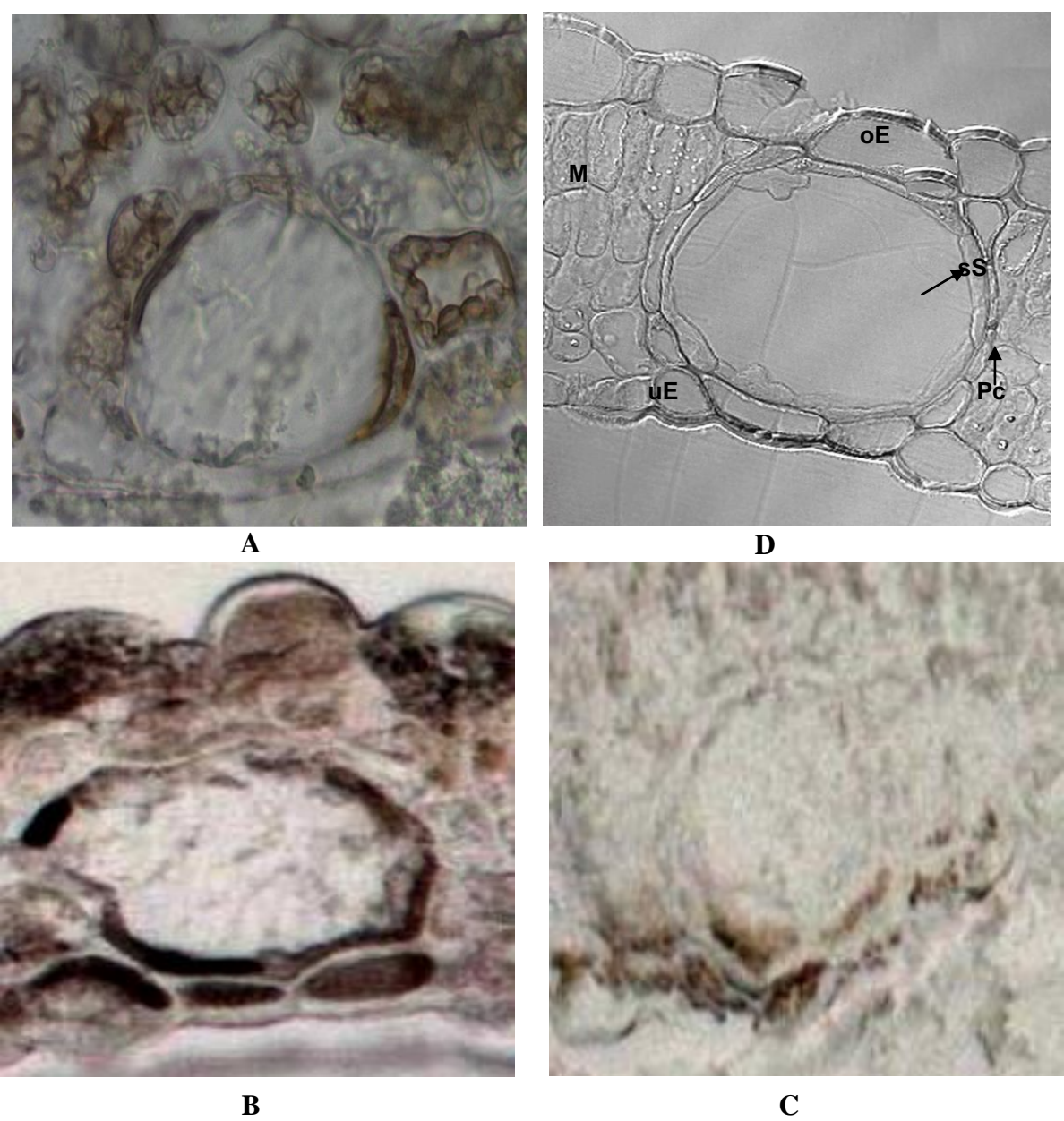
Das HpaBPS-Transkript wurde nur in der unteren Epidermis gefunden (Abb. 4.47). Die Expression war allerdings sehr schwach. Es gab keine Expression des *HpaBPS*-Gens in den schizogenen Drüsen.

Im Gegensatz dazu war das *HpBUS*-Gen in den Drüsenzellen relativ stark exprimiert (Abb. 4.45 - 4.47). Das HpBUS-Transkript wurde in den Leitbündelzellen beobachtet. Aber diese Expression ist nicht reproduzierbar. Es wurde auch in den Epidermen exprimiert, stärker in der unteren als in der oberen Epidermis.





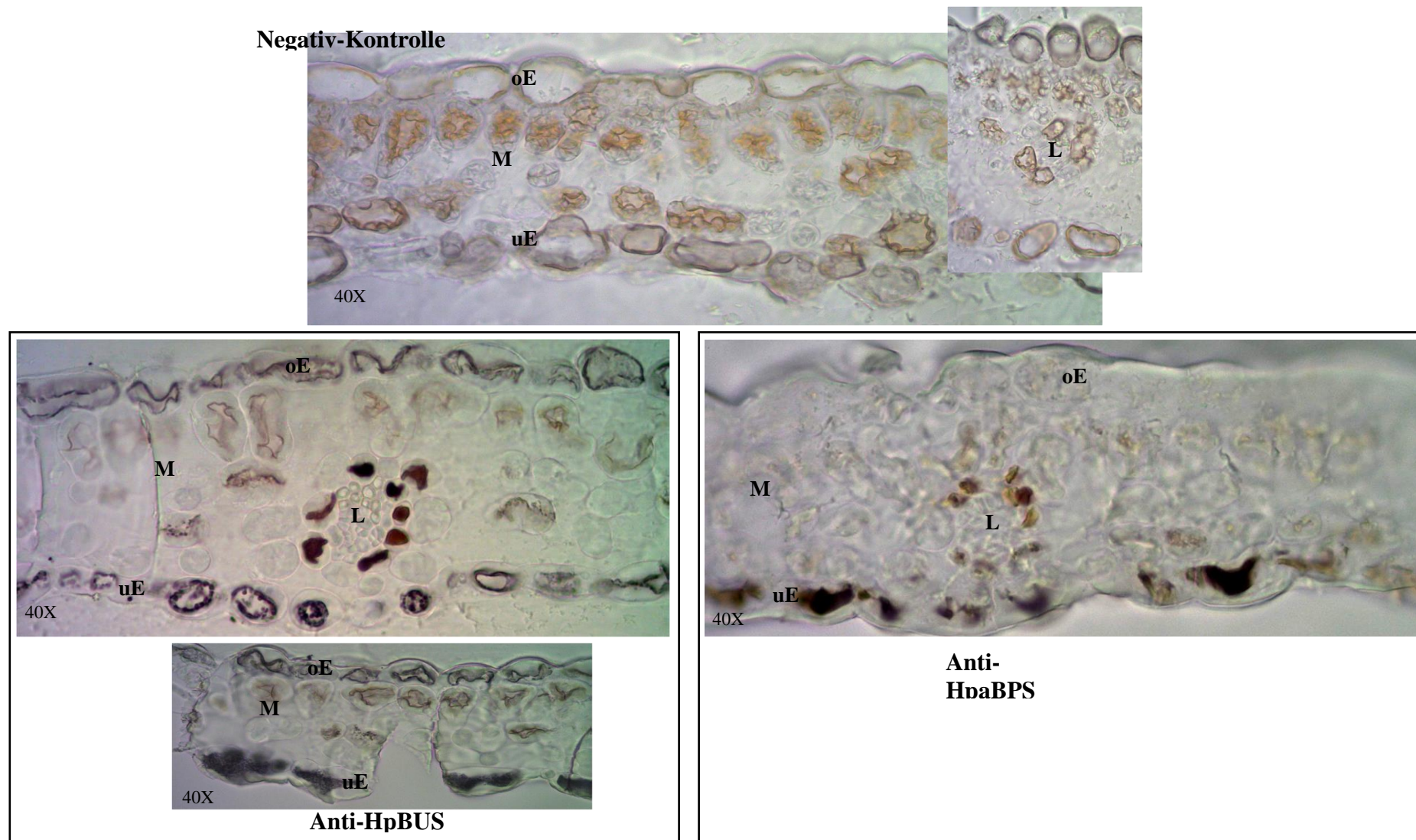
**Abb. 4.45:** Querschnitt von *H. perforatum*-Sprosskulturblättern nach ISH. A: Negativ-Kontrolle; B: Anti-HpBUS; C: Anti-HpaBPS



**Abb. 4.46:** Expression von HpBUS und HpaBPS-Transkript in Drüsen

A: Negativ-Kontrolle; B: Anti-HpBUS; C: Anti-HpaBPS; D: Drüsenstruktur  
oE: obere Epidermis; uE: untere Epidermis; Pc: Parenchym; sS: schizogene Sekretbehälter; M: Mesophyll; D: Drüsen





**Abb. 4.47:** Expression von HpBUS und HpaBPS-Transkripts in den Leitbündelzellen (L), der oberen und unteren Epidermis

#### 4.19 Detektion von Enzymaktivitäten in Zellkulturen

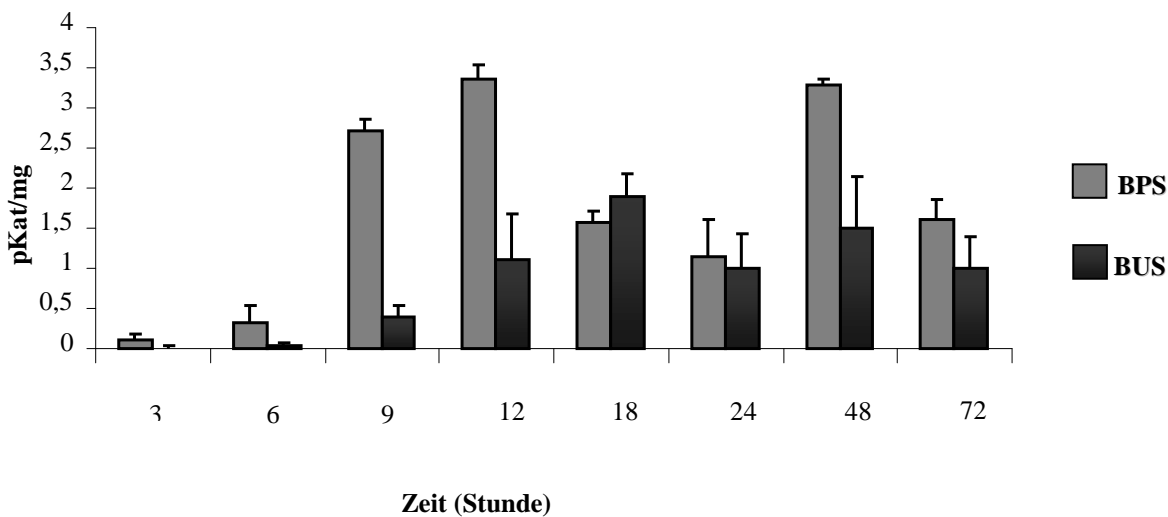
In vielen Zellkulturen kann die Produktion von Sekundärmetaboliten durch Zugabe von Elizitoren stimuliert werden. Dass im Johanniskraut Hyperforine, Xanthone, Flavonoide und Hypericine vorkommen, wies darauf hin, dass es vier Polyketid-Synthasen geben sollte. Die an der Bildung der ersten drei Stoffklassen beteiligten Enzymaktivitäten wurden in *H. perforatum* subsp. *angustifolium*-Zellkulturen geprüft. Zum Elizitieren wurden ein Transfer in „BDS-Medium“ und Chitosan benutzt. Die Wirkung dieser Elizitoren auf die Produktbildung wurde analysiert.

Zellfreie Extrakte (3.2.8) wurden mit Isobutyryl-CoA, Benzoyl-CoA und *p*-Cumaroyl-CoA in Gegenwart von Malonyl-CoA inkubiert. Durch nachfolgende HPLC-Analyse konnte die Bildung eines Produkts nur mit Isobutyryl-CoA bzw. Benzoyl-CoA detektiert werden. In Kontrollinkubationen mit denaturiertem Protein wurden die Produkte nicht nachgewiesen, so dass es sich um enzymatische Produkte handelte.

Um zu untersuchen, ob es sich bei den detektierten Enzymaktivitäten wirklich um eigenständige Enzyme handelt oder eventuell ein Enzym mehrere Substrate umsetzt, wurde zu verschiedenen Zeitpunkten des Zellkulturwachstums ein Enzymextrakt gewonnen und mit den drei Substraten Isobutyryl-CoA, Benzoyl-CoA und *p*-Cumaroyl-CoA inkubiert. Die Inkubationsprodukte wurden mittels HPLC analysiert und unter Verwendung von Standardlösungen der Referenzsubstanzen Phlorisobutyrophenon, Phlorbenzophenon und Naringenin quantifiziert. Die spezifischen Aktivitäten wurden berechnet und die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten als Mittelwerte in Abb. 4.48 und 4.49 zusammengefasst.

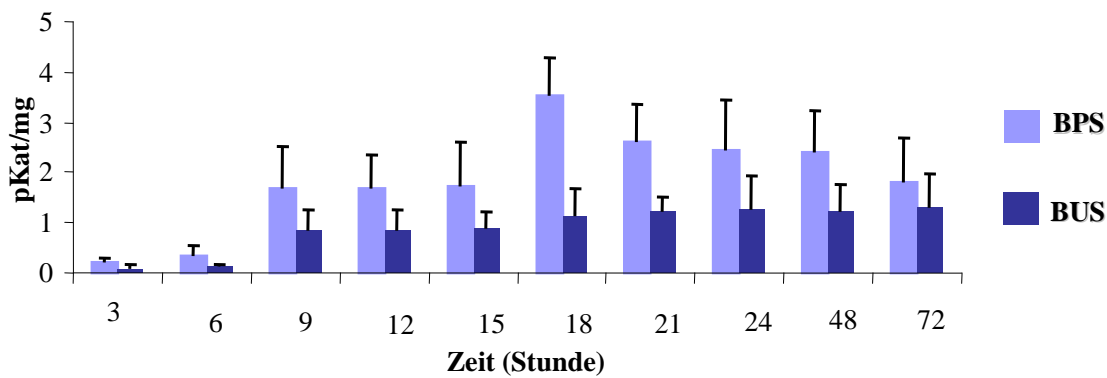
Nach der Induktion sowohl mit Chitosan als auch BDS-Medium konnte keine Chalkon-Synthase-Aktivität gefunden werden. Es wurden nur die Isobutyrophenon-Synthase- und die Benzophenon-Synthase-Aktivität detektiert. Die Isobutyrophenon-Synthase-Aktivität stieg langsamer nach der Induktion mit Chitosan an und erreicht ihr Maximum nach 18 Stunden. Die Benzophenon-Synthase-Aktivität stieg schneller an und erreicht ihr Maximum schon nach 12 Stunden, dann nahm die Aktivität ab. Beide Enzymaktivitäten zeigten ein zweites Maximum nach 48 h (Abb. 4.48). Die Elizitierung mit Chitosan führte zu stärkerer Bildung von Phlorbenzophenon als Phlorisobutyrophenon.





**Abb. 4.48:** Aktivitäten von BPS und BUS in *H. perforatum subsp. angustifolium*-Zellkulturen nach Induktion mit Chitosan

Nach der Überimpfung der Zellen in BDS-Medium stieg die Isobutyrophenon-Synthase-Aktivität nach 6 Stunden an. Es folgte annähernd ein Plateau bis 72 Stunden. Die Benzophenon-Synthase-Aktivität erreichte ihr Maximum nach 18 Stunden, wonach die Aktivität langsam abnahm (Abb. 4.49).



**Abb. 4.49:** Aktivitäten von BPS und BUS in *H. perforatum subsp. angustifolium*-Zellkulturen nach Transfer in BDS-Medium

## 5 Diskussion

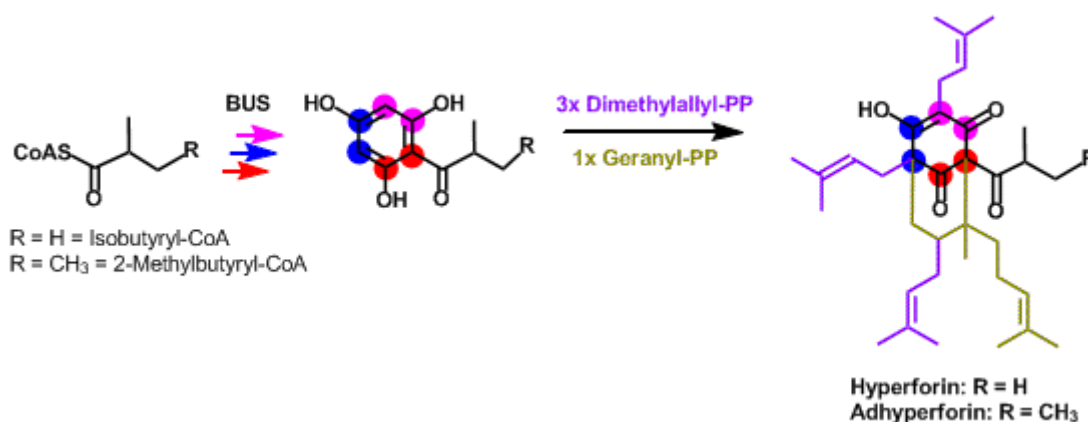
### 5. 1 Klonierung, Charakterisierung, Mutagenese und Lokalisierung der HpBUS

#### 5.1.1 cDNA-Klonierung und Charakterisierung der HpBUS

Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.) wird seit langem zur Behandlung leichter bis mittelschwerer depressiver Erkrankungen verwendet. An der antidepressiven Wirkung von *Hypericum*-Präparaten sind vor allem die Hyperforine beteiligt, eventuell auch noch Hypericine und Flavonoide (Müller, 2003; Butterweck, 2003). Der am besten untersuchte Inhaltsstoff ist das Hyperforin, das ein strukturell wie funktionell neuartiges Antidepressivum darstellt (Müller, 2003).

Auf der Gewebe-Ebene wurde Hyperforin in den durchscheinenden Drüsen lokalisiert, wo es zusammen mit ätherischem Öl abgelagert wird (Kornfeld et al., 2007). Diese schizogenen Drüsen kommen vor allem in Blättern, dem Stempel und Früchten vor. Auch Flavonoide akkumulieren hauptsächlich in älteren Knospen und Blüten, aber hier in den Petalen, die später abfallen (Tekelova et al., 2000).

Die Hyperforin-Biosynthese kann in zwei Abschnitte gegliedert werden: erstens die Bildung des Grundgerüsts und nachfolgend die Prenylierungsreaktionen (Abb. 5.1).



**Abb. 5.1:** Biosynthese des Hyperforins und des Adhyperforins

([http://www.biologie.uni-freiburg.de/data/bio2/schroeder/Hyperforin\\_Syn\\_de.html](http://www.biologie.uni-freiburg.de/data/bio2/schroeder/Hyperforin_Syn_de.html))

Die Bildung des Grundgerüsts wurde in den Zellkulturen von *H. calycinum* nachgewiesen (Klingauf et al., 2005). Sie wird von einer Typ III-PKS, der Isobutyrophenon-Synthase (BUS), katalysiert. Dieses Enzym kondensiert das aliphatische Startermolekül Isobutyryl-CoA, das aus Valin gebildet wird (Karpinnen et al., 2007), mit drei Molekülen Malonyl-CoA

zu einem intermediären Tetraketid, das im selben aktiven Zentrum zum Phlorisobutyrophenon zyklisiert wird (Abb. 5.2).

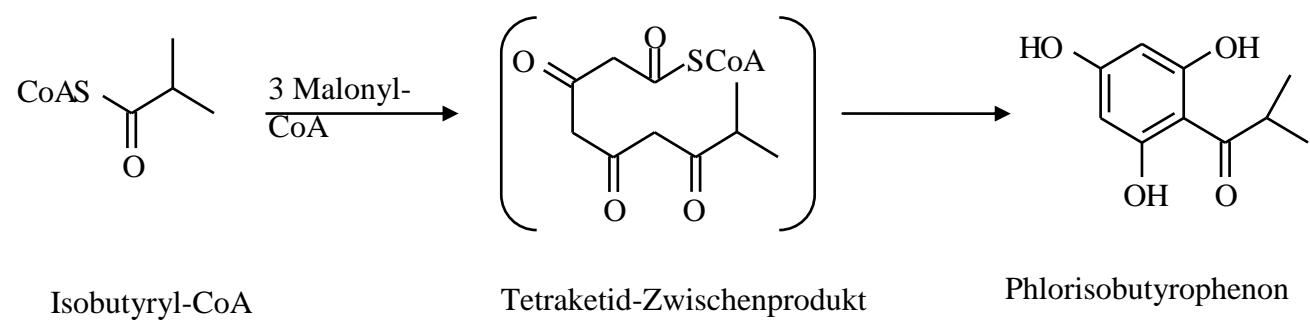


Abb. 5.2: Reaktion der Isobutyrophenon-Synthase (BUS)

Es wurde in der vorliegenden Arbeit eine BUS-cDNA aus *Hypericum perforatum*-Blüten (HpBUS) erfolgreich kloniert und heterolog exprimiert. Der kodierende Bereich der BUS-mRNA umfasste 1188 Basen, entsprechend 395 Aminosäuren mit 42,63 kDa. Die HpBUS hat 91 % Identität mit der BPS aus *H. perforatum* (HpBPS), die von Klingauf (2004) kloniert und exprimiert wurde, aber inaktiv war, und 93,9 % Identität mit einer BPS aus *H. perforatum* in der Datenbank ([ABP49616.1](#)) (Tab. 5.1). Im Vergleich der Aminosäuresequenzen von HpBUS und den beiden BPS ergab sich eine vier Aminosäuren umfassende Lücke am 5´ Ende der von Klingauf (2004) klonierten HpBPS. Diese vier fehlenden Aminosäuren könnten vielleicht einen Zusammenhang mit der Inaktivität dieser HpBPS haben (Abb. 5.3).

Tab. 5.1: Prozentuale Identität von HpBUS mit BPS aus *H. perforatum* auf Aminosäurenebene

Identität (%)	1	2	3
1 BUS <i>H. perforatum</i>		93,9	91,0
2 BPS <i>H. perforatum</i> (Datenbank)			91,0
3 BPS <i>H. perforatum</i> (Klingauf, 2004)			

	10	20	30	40	50	60	70	80	
1	MAPAMEYSTQNGQGGGKKRASVLAI GTTNPEHFI LQEEYPDFYFRNTNSEHMTDLKEKFKRI CVKSHTRKRHFYLT EEI L								BUS <i>H. perforatum</i>
1	MAPAMEYSTENMQEEGKKRASVLAI GTTNPEHFI LQEDYPDFYFKNTNSEHMT ELKEKFKRI CVKSHTRKRHFYLT EDI L								BPS <i>H. perforatum</i> (Datenbank)
1	MAPAMEYSTQ...EGNRASVLAI GTTNPDHFI LQEDYPDFYFKNTNSDHMVELKEKFKRI CVKSHTRKRHFYLT DEI L								BPS <i>H. perforatum</i> (Klingauf)
	90	100	110	120	130	140	150	160	
81	KENQGI ATYGAGSLDARQRI LETEVPKLGQEAALKAI AEWGQPI SKI THVVFATTS GFMMPGADYAI TRLLGLNRTVRRV								BUS <i>H. perforatum</i>
81	KENQGI ATYGAGSLDARQRI LETEVPKLGQEAALKAI AEWGQPI SKI THVVFATTS GFMMPGADYAI TRLLGLNRTVRRV								BPS <i>H. perforatum</i> (Datenbank)
77	KANFGI ATYGAGSLDARQRI LETEVPKLG ER AALKAI SEWGQPI SKI THVVATTSGFMMPGADYAI TRLLGLNRTVRRV								BPS <i>H. perforatum</i> (Klingauf)
	170	180	190	200	210	220	230	240	
161	MLYNQGC FAGGTALRI AKDLAENN EGARVLV VCAENTAMT FHAPNES HLDVI VGQAMFSDGAAALI I GAGPDAAS GERAV								BUS <i>H. perforatum</i>
161	MLYNQGC FAGGTALRM AKDLAENN ANARVLV VCAENTAMT FHAPNES HLDVI VGQAMFSDGAAALI MGANPDTSV GERAV								BPS <i>H. perforatum</i> (Datenbank)
156	MLYNQGC FAGGTALRM AKDLAENN EGARVLV VCAENTAMT FHAPNES HLDVI VGQAMFSDGAAALI I GAGPDAAS GERAV								BPS <i>H. perforatum</i> (Klingauf)
	250	260	270	280	290	300	310	320	
241	FNI LSASQTI VPGSDGAI TAHFYEMGMS YFLKEDVI TILFRDNI AAVMEEAFSPLGVSDWNLSFYSI HPGGRGI I DGVAGN								BUS <i>H. perforatum</i>
241	FNI LSASQTI VPGSDGAI TAHFYEMGMS YFLKEDVI PLFRDNI ADVMK EAFSPLGVSDWNLSFYSI HPGGRGI I DGVAGN								BPS <i>H. perforatum</i> (Datenbank)
236	FNI LSASQTI VPGSDGAI T HFYEMGMS YFLKEDVI PLFRDNI AAVMEEAFSPLGVSDWNLSFYSI HPGGRGI I DGVAGN								BPS <i>H. perforatum</i> (Klingauf)
	330	340	350	360	370	380	390		
321	LGI KDENLVATRHVLGEYGNMGSA CVVMFI LDELRRSS KLNGKPTTGDGKEFGCLI GLGPGLTVEAVVLQGVGI LH								BUS <i>H. perforatum</i>
321	LGI KDENLVATRHVLGEYGNMGSA CVVMFI LDELRRSS KLNGKPTTGDGKEFGCLI GLGPGLTVEAVVLQSVFI LQ								BPS <i>H. perforatum</i> (Datenbank)
315	LGI KDENLVATRHVLGEYGNMGSA CVVMFI MDELRRSS KLNGKPTTGDGKEFGCLI GLGPGLTVEAVVQSVFI LQ								BPS <i>H. perforatum</i> (Klingauf)

Abb. 5.3: Vergleich der Aminosäuren-Sequenzen von HpBUS und BPS aus *H. perforatum*

Nach der Inkubation des HpBUS-Proteins mit verschiedenen Starter-Substraten (aliphatischen und aromatischen) ergab sich die höchste Aktivität mit Isobutyryl-CoA, und ca. 95% relative Aktivität mit Benzoyl-CoA. Diese Ergebnisse sind in radioaktiven Enzymsätzen mit [2-<sup>14</sup>C] Malonyl-CoA bestätigt worden. Der Vergleich der Substratspezifitäten von HpBUS und BPS aus anderen *Hypericum*-Spezies zeigte, dass HaBPS, HcBPS und HsBPS Benzoyl-CoA bevorzugen. Sie akzeptieren an zweiter Stelle 3-Hydroxybenzoyl-CoA. Sie katalysieren auch die Umsetzung der aliphatischen Substrate Isobutyryl-, Isovaleryl- und Butyryl-CoA, aber die Produktmengen waren deutlich geringer als mit aromatischen Substraten (25-33% relative Aktivitäten). Die HpaBPS hatte 100% Aktivität mit Benzoyl-CoA, 46% Aktivität mit Isobutyryl-CoA und 43% Aktivität mit 3-Hydroxybenzoyl-CoA. Sie akzeptierte auch Isovaleryl- und Butyryl-CoA. Im Gegensatz dazu hatte die HpBUS 47,5% Aktivität mit Isovaleryl-CoA und 17,6% Aktivität mit Butyryl-CoA, aber niedrigere Aktivität mit 3-Hydroxybenzoyl-CoA (Tab. 4.5-4.9).

Da die HpBUS bei Substratsättigung Isobutyryl-CoA und Benzoyl-CoA ähnlich umsetzte, wurden die kinetischen Daten für beide Substrate berechnet. Der  $K_m$ -Wert für Isobutyryl-CoA betrug 1,9  $\mu$ M und der  $K_{cat} / K_m$ -Koeffizient war  $13684,2 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ . Im Gegensatz dazu betrug der  $K_m$ -Wert für Benzoyl-CoA 11,75  $\mu$ M und der  $K_{cat} / K_m$ -Koeffizient  $2127,65 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ . Das Enzym hat also eine 6,5-fach höhere Affinität zu Isobutyryl-CoA als zu

Benzoyl-CoA, während die Umsatzraten ( $K_{\text{cat}}$ ) ähnlich waren, was die ähnlichen Aktivitäten bei der Ermittlung der Substratspezifität erklärte.

Ferrer et al. (1999) gelang die erste Röntgenanalyse der Kristallstruktur einer CHS aus Luzerne (*Medicago sativa*). Damit wurde die exakte Untersuchung des Mechanismus einer PKS Typ III möglich. Bis heute sind weitere Kristallstrukturen dieser CHS mit verschiedenen Mutationen und Liganden veröffentlicht worden (Austin et al., 2004). Auch die Raumstrukturen funktionell andersartiger Typ III PKS wurden mittlerweile aufgeklärt (Shomura et al., 2005).

Ein Vergleich des aktiven Zentrums der HpBUS mit dem der CHS wurde durchgeführt, um eventuelle Funktionen einzelnen Aminosäuren der HpBUS zuzuordnen. Das aktive Zentrum der CHS besteht aus drei Bereichen: zunächst die katalytische Triade, die in allen PKS Typ III vorkommt und die Aminosäuren Histidin 303, Asparagin 336 und Cystein 164 umfasst. Ein weiterer Teil des aktiven Zentrums ist die so genannte Initiationstasche. Sie besteht aus vier Aminosäuren. Der größte Teil der katalytischen Tasche besteht aus acht Aminosäuren. Hier findet die Kettenverlängerung statt, deshalb wird sie Elongationstasche genannt. Die verwendeten Aminosäure-Nummerierungen beziehen sich in der Regel auf die CHS als Prototyp. Nachfolgend werden in Abb. 5.4 die Aminosäuren und deren Positionen in der Initiations- und Elongationstasche sowie in der katalytischen Triade der CHS bzw. HpBUS gegenübergestellt.

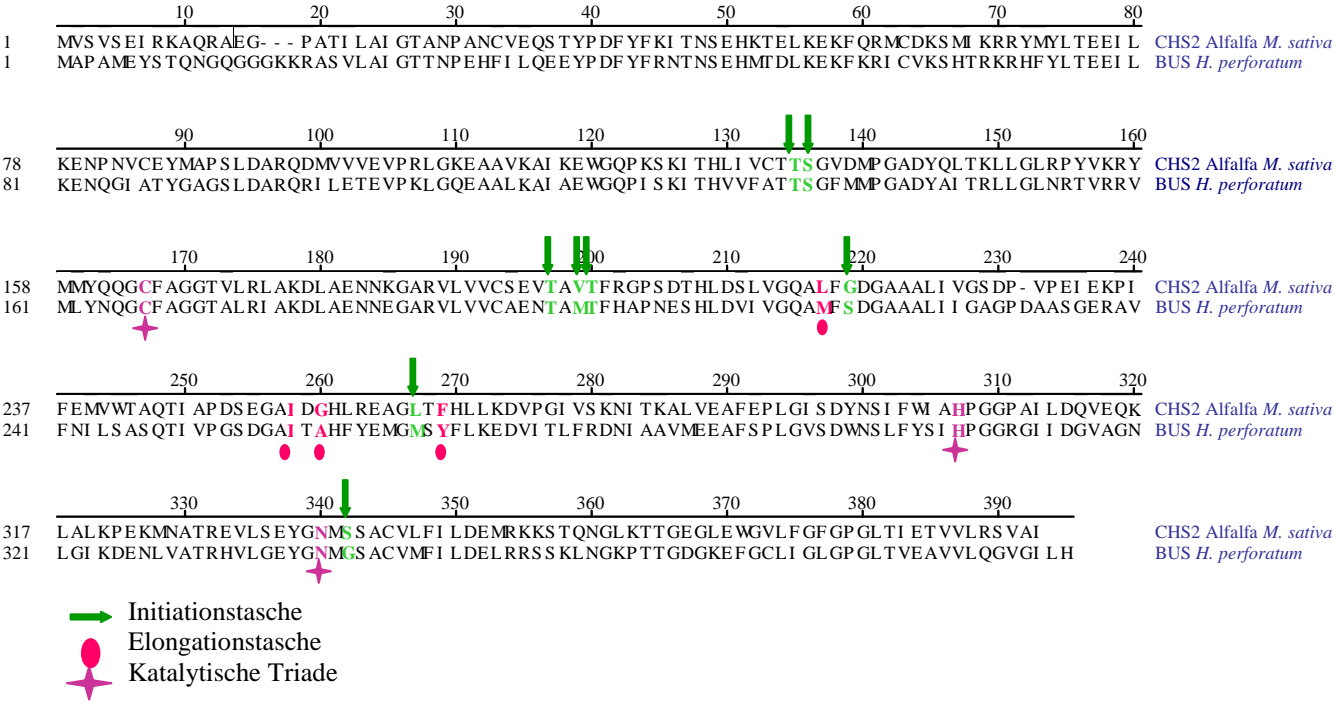


Abb. 5.4: Vergleich der Aminosäuren der aktiven Zentren von *M. sativa* CHS2 und HpBUS

5.1.2 Mutagenese der HpBUS

Der Vergleich der klonierten HpBUS mit den oben erwähnten vier BPS ergab Unterschiede in nur wenigen Aminosäuren. Die Identitäten lagen zwischen 93 und 98 % (Tab. 4.10). HpBUS unterscheidet sich von den BPS, abgesehen von den terminalen Bereichen, in nur drei Positionen (Abb. 4.31). Das verleitete zu der Idee, die HpBUS in Richtung der anderen BPS zu mutieren, um die Bedeutung der entsprechenden Aminosäuren für die Substratspezifität der HpBUS zu untersuchen.

Die zwei Einzelmutationen T68I und T277P ergaben keine große Veränderung der Spezifität. Sie entsprachen dem Wild-Typ, aber mit geringerer Aktivität. Im Gegensatz dazu ergab der Austausch der unpolaren Aminosäure Isoleucin in der Position 176 zur unpolaren Aminosäure Valin eine Valerophenon-Synthase (VPS). Sie akzeptierte sowohl Isovaleryl-CoA als auch Isobutyryl-CoA wie die VPS aus *Humulus lupulus* (Paniego et al., 1999; Okada et al., 2001).

Bei der heterologen Expression ähnelten die Ausbeuten der T68I und der T277P-Mutante der des Wild-Typs (0,2 mg L<sup>-1</sup>), während die Ausbeute der HpBUS-I176V-Mutante sieben mal höher lag. .

Die Doppelmutation (T277P/I176V) ergab auch eine VPS. Diese Doppel-Mutante unterscheidet sich von der Einzelmутante I176V im zweiten Starter-Substrat, sie setzte am besten Isovaleryl-CoA um, dann Benzoyl-CoA und Isobutyryl-CoA. Die zwei Doppelmutationen (T68I/T277P) und (T68I/I176V) ergaben jeweils eine BUS. Auch sie unterschieden sich vom Wild-Typ in der Substratspezifität. Die Doppel-Mutante (T68I/T277P) akzeptierte an zweiter Stelle Isovaleryl-CoA (89%), dann Butyryl-CoA (64%) und Benzoyl-CoA (61%). Die Doppel-Mutante (T68I/I176V) akzeptierte an zweiter Stelle Benzoyl-CoA (82%), dann 3-Hydroxybenzoyl- (45%) und Isovaleryl-CoA (44%).

Durch eine Tripelmutation (T68I/I176V/T277P) konnte die HpBUS in eine BPS überführt werden. Diese HpBUS-Mutante hatte die höchste Aktivität mit Benzoyl-CoA wie die anderen natürlichen BPS. Es gab zwei Nebenprodukte: ein Tetraketid-Lakton (Nualkaew et al., 2012) und ein Triketid-Lakton. Obwohl die Ausbeute der Tripel-Mutante fünfzehn Mal ( $3 \text{ mg L}^{-1}$ ) höher war als die des Wild-Typs, war auch die Ausbeute der drei Doppel-Mutanten zehn Mal ( $2 \text{ mg L}^{-1}$ ) mehr als die des Wild-Typs. Diese Doppel- und Tripel-Mutationen behielten ihre Aktivität bis einen Tag nach der Proteinexpression.

Die Inkubation von Wildtyp-Protein mit Hexanoyl-CoA/Malonyl-CoA ergab ein Triketid-Lakton. Im Gegensatz dazu ergaben die Inkubationen der Enzym-Mutanten, mit Ausnahme der Mutante T86I, mit Hexanoyl-CoA/Malonyl-CoA sowohl ein Phloroglucinol-Derivat als auch ein Triketid-Lakton.

Die Tripelmutante T68I/I176V/T277P und die Doppelmutation T277P/I176V wurden charakterisiert. Für die Tripelmutante waren die optimalen Reaktionsbedingungen ( $35^\circ\text{C}$ , pH 7) mit den publizierten Daten für die HaBPS (Liu et al., 2003) und den in Doktorarbeiten aufgeführten Ergebnissen für die HcBPS und die HpaBPS (Klingauf, 2004; Tocci, 2012) vergleichbar. Der  $K_m$ -Wert für Benzoyl-CoA betrug  $2,3 \mu\text{M}$  und der  $K_{\text{cat}}/K_m$ -Koeffizient war 6,5 Mal höher als der des Wild-Typs, d.h dass diese Mutante eine höhere Aktivität mit Benzoyl-CoA aufwies als der Wild-Typ. Dieser Wert ist mit dem  $K_m$ -Wert von Benzoyl-CoA der HpaBPS (Tocci, 2012) vergleichbar. Außerdem war der  $K_m$ -Wert für Benzoyl-CoA der anderen BPS drei oder vier (HcBPS; HaBPS; BPS aus *Garcinia mangostana*: GmBPS) bis sieben Mal (HsBPS) höher als der der HpBUS-Tripelmutante (Tab. 5.2).

**Tab. 5.2:**  $K_m$ -Werte für Benzoyl- und Malonyl-CoA verschiedener BPS

	Benzoyl-CoA		Malonyl-CoA
	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_{cat}/K_m$ ( $\text{M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$ )	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )
HaBPS (Liu et al., 2003)	5,7	28345,0	23,1
HcBPS (Klingauf, 2004)	8,4	1343,0	13,3
HsBPS (Huang et al., 2012)	15,8	25028,0	92,5
HpaBPS (Tocci, 2012)	1,99	3897,07	12,09
GmBPS (Nualkaew et al., 2012)	9,65	5135,5	16,38
HpBUS (Wild-Typ)	11,75	2127,7	-
HpBUS-Tripelmutante (T68I/I176V/T277P)	2,3	13913,0	13,5

Die optimalen Reaktionsbedingungen (30 °C, pH 6,5) für die Doppel-Mutante (T277P/I176V) waren mit den Wildtyp-Daten identisch. Der  $K_m$ -Wert für Isovaleryl-CoA war 6,5  $\mu\text{M}$  und für Malonyl-CoA 33  $\mu\text{M}$  (wie beim Wild-Typ).

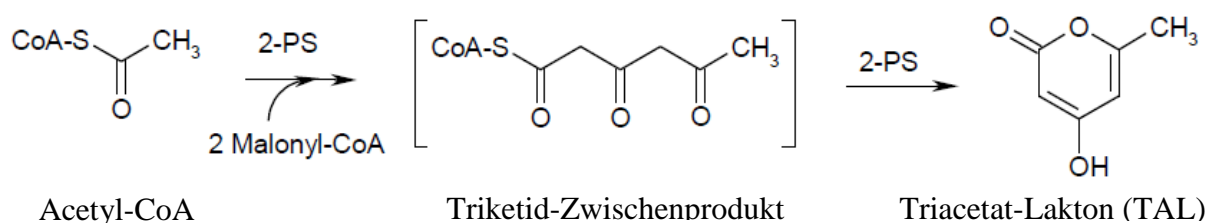
Klundert et al. (2009) hatten das Threonin in der Position 135 in HaBPS zu Leucin verändert. Diese Mutation ergab eine dramatische Veränderung in der Produktspezifität, es resultierte eine Phenylpyron-Synthase. Bei der Inkubation mit Benzoyl-CoA ist das Hauptprodukt der T135L-Mutante nicht das 2,4,6-Trihydroxybenzophenon, sondern das Lakton 4-Hydroxy-6-phenylpyran-2-on. Dies gilt auch für das Starter-Substrat 3-Hydroxybenzoyl-CoA. Es entsteht nur eine geringe Menge an 4-Hydroxy-6-(3-hydroxy)-phenylpyran-2-on und kein 2,3',4,6-Tetrahydroxybenzophenon. Die gleiche Mutation ist in GmBPS (Nualkaew et al., 2012) untersucht worden und sie ergab ebenfalls eine Phenylpyron-Synthase. Die Aminosäure Threonin ist auch in der HpBUS-Aminosäuresequenz vorhanden. Deswegen wurde die interessante Mutation T135L auch in HpBUS vollzogen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Klundert et al. (2009) und Nualkaew et al. (2012) zeigte die HpBUS-T135L-Mutante keinerlei Aktivität, weder mit den aliphatischen noch den aromatischen Starter-Substraten. Die HpBUS-T135L-Mutante war inaktiv.

Viele Studien haben bereits den Einfluss von Mutationen auf die Substrat- und Produktspezifität von Typ III PKS gezeigt. Die Pentaketid-Synthase (PCS) wurde durch die Einzelmutation M207G funktionell in eine Oktaketid-Synthase (OKS) umgewandelt. Die OKS M207G-Mutante produzierte das isomere Pentaketid 5,7-Dihydroxy-2-methylchromon



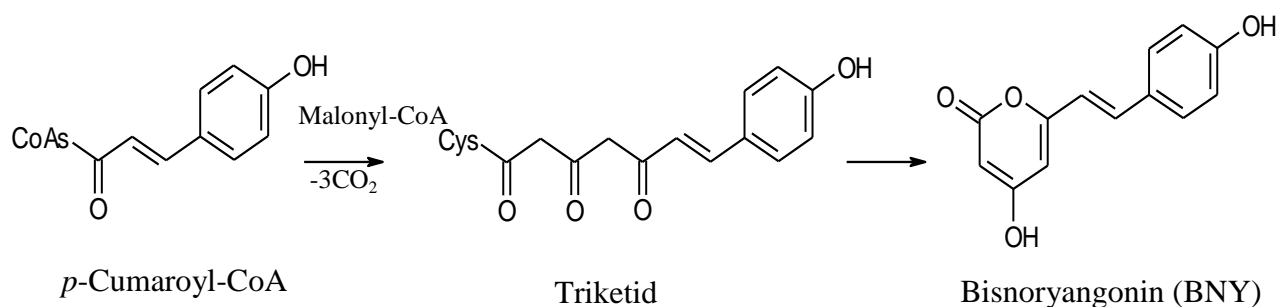
statt SEK4 und SEK4b (Nebenprodukte der OKS). Die N222G-OKS-Mutante bildete das Decaketid SEK 15, das aus 10 Molekülen Malonyl-CoA produziert wurde. Außerdem wurden die unnatürlichen C<sub>18</sub> Phloroglucinol- und C<sub>16</sub> Resorcinol-Derivate aus Hexanoyl-CoA/Malonyl-CoA und das C<sub>19</sub> Heptaketid-Benzophenon aus Benzoyl-CoA und 6 Molekülen Malonyl-CoA gebildet (Morita et al., 2007; Shi et al., 2009).

Aus den Arbeiten von Jez et al. (2000) geht hervor, dass durch eine Tripelmutation (T197L/G256L/S338I) aus der CHS von *Medicago sativa* eine 2-Pyron-Synthase (2-PS) gebildet wird, wie sie in *Gerbera hybrida* vorkommt (Helariutta et al., 1995). Die 2-PS katalysiert die Kondensation von einem Moleküle Acetyl-CoA mit zwei Molekülen Malonyl-CoA zu einem Triacetat-Lakton (TAL) (Abb. 5.5).



**Abb. 5.5:** Reaktion der 2-Pyron-Synthase

Die Benzalaceton-Synthase (BAS) besitzt eine Aminosäuresequenz-Identität zur CHS aus *Luzerne* von ca. 75 %. BAS akzeptiert ebenso wie CHS als Startersubstrat *p*-Cumaroyl-CoA. Im Gegensatz zur CHS aber wird dieses nur einmal mit Malonyl-CoA zu einem Diketid verknüpft, aus dem dann Benzalaceton entsteht. Bei dem Vergleich der beiden Sequenzen fällt auf, dass in der BAS eine Aminosäure, die sonst in allen pflanzlichen PKS Typ III an dieser Position vorkommt, verändert ist. BAS besitzt an Position 215 (Zählweise der CHS aus *Luzerne*) ein Leucin, sämtliche anderen PKS Typ III haben an Position 215 aber ein Phenylalanin. Durch punktuelle Mutationen wurden an den Positionen 214 und 215 die Aminosäuren Isoleucin und Leucin zu Leucin bzw. Phenylalanin umgewandelt. Dies führte dazu, dass bei der CHS -Doppelmutante nunmehr Naringenin-Chalkon zum Nebenprodukt wird und Bisnoryangonin (BNY) als Hauptprodukt entsteht (Abb. 5.6) (Abe et al., 2003; Morita et al., 2009). Die umgekehrte Vorgehensweise, also eine Mutation der BAS in Richtung CHS führt dazu, dass keinerlei BAS-Aktivität messbar ist. Stattdessen wird BNY als Hauptprodukt detektiert.



**Abb. 5.6:** Reaktion der CHS-Mutante LF214/215IL bei Inkubation mit Malonyl-CoA und *p*-Cumaroyl-CoA (Abe et al., 2003)

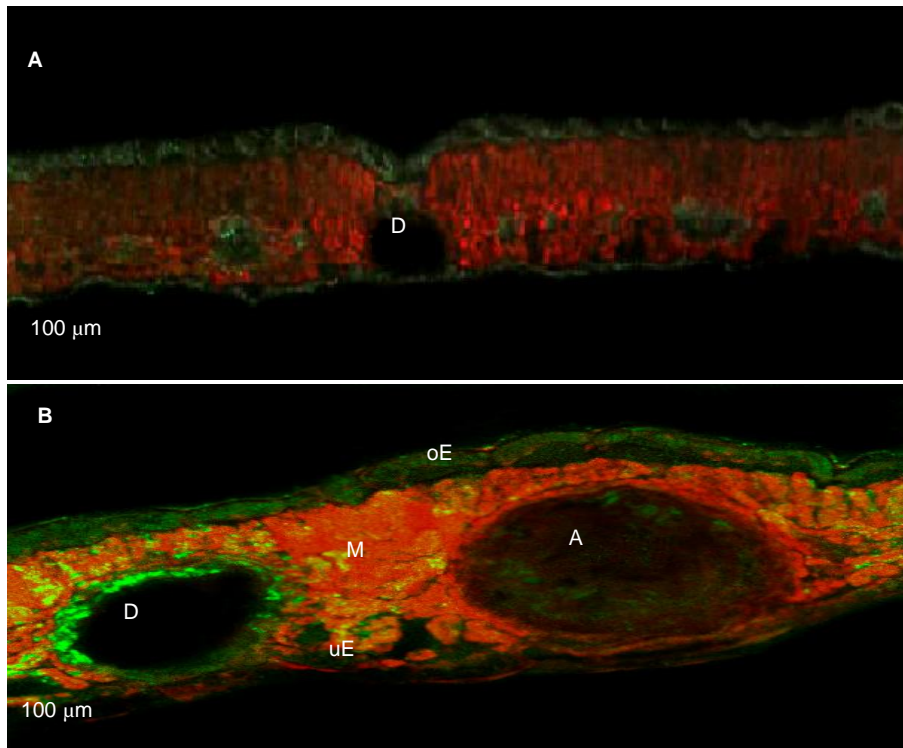
### 5.1.3 Lokalisierung der HpBUS in *H. perforatum* Sprosskulturen

*Hypericum perforatum*-Blätter besitzen helle Drüsen und schwarze Zellaggregate. Die schwarzen Areale enthalten Hypericine als Pigmente, die hellen Drüsen ätherisches Öl (Zobayed et al., 2006; Kornfeld et al., 2007). Karpinen et al. (2008) studierten mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung (ISH) die Lokalisierung der Oktaketid-Synthase (PKS2), die eine Beziehung zur Hypericin-Biosynthese hat, in den schwarzen Zellaggregaten. Hölscher et al. (2009) zeigten mittels MS-Imaging, dass Hypericine in den schwarzen Arealen lokalisiert sind. Nach Soelberg et al. (2007) wurde ein hoher Hyperforin-Gehalt (7 mg g<sup>-1</sup> Frischmaterial) aus durchscheinenden Drüsen isoliert. Im Gegensatz dazu wurden nur Spuren von Hyperforin im umgebenden nicht-sekretorischen Gewebe gefunden. Somit stellte sich heraus, dass Hyperforin hauptsächlich in den sekretorischen Strukturen und dem durchscheinenden Speicherraum von hellen Drüsen vorkommt. In den dunklen Aggregaten wurden nur kleine Mengen von Hyperforin (etwa 0,4 mg g<sup>-1</sup> Frischmaterial) gefunden, d.h. die dunklen Bereiche sind kein Ort, um Hyperforine zu akkumulieren.

Es gibt einen Hinweis darauf, dass Hyperforine in den hellen Drüsen, konkreter den flachen umgrenzenden Zellen synthetisiert werden: Die lipophilen Isoprenoid-Gruppen der Hyperforine werden durch den gleichen Stoffwechselweg hergestellt wie Monoterpene, die Bestandteile des ätherischen Öls in den Drüsen sind (Ciccarelli et al., 2001; Adam et al., 2002; Hölscher et al., 2009). Somit ist es offensichtlich, dass die Biosynthesen von ätherischem Öl und Hyperforinen eng verbunden sind, und es kann postuliert werden, dass ihre Synthesen am gleichen Ort erfolgen.

Belkheir (2009) studierte das Vorkommen der BPS in verschiedenen Pflanzenteilen von *H. perforatum*. Sie entdeckte eine starke Immunfluoreszenz in Blättern, und zwar genau in den hellen Drüsen. Die Abbildung 5.7 zeigt die spezifische Fluoreszenz in Blättern nach der

Detektion der BPS mit dem Antikörper Anti-6xHis-BPS-IgG. Es ergab sich eine starke Fluoreszenz in der inneren Zellschicht der Drüsen, die den Akkumulationsraum umgibt. Im Gegensatz dazu gab es keine Fluoreszenz in den schwarzen Zellaggregaten.



**Abb. 5.7:** Immunolokalisierung der BPS in einer durchscheinenden Drüse von *H. perforatum*-Blättern (aus Belkheir, 2009). Im schwarzen Zellaggregat tritt keine Fluoreszenz auf.

A: Präimmun-Kontrolle; B: Immunolokalisierung der BPS

oE: obere Epidermis; uE: untere Epidermis; M: Mesophyll; D: schizogene Drüse; ; A: schwarzes Zellaggregat

Da die durchscheinenden Drüsen die Bildungs- und Speicherorte des Hyperforins sind, sollte eine Immunlokalisierung der BPS, die an der Xanthon-Biosynthese beteiligt ist, nicht in diesen Drüsen erfolgen. Nach dem Vergleich der HpBUS und den BPS Sequenzen stellt man fest, dass die Ergebnisse von Belkheir (2009) allerdings zu erwarten sind. Es gibt keinen großen Unterschied zwischen der HpBUS, deren cDNA hier erstmals kloniert wurde, und den BPS-Aminosäuresequenzen. Eine Kreuzreaktion der von Belkheir eingesetzten Antikörper mit der HpBUS ist somit zu erwarten. Deswegen wurde in dieser Arbeit die ISH als spezifischere Methode gewählt, um die Lokalisierung der HpaBPS und der HpBUS zu untersuchen.

Tocci (2012) fand, dass Wurzeln von *H. perforatum* subsp. *angustifolium* mehr Xanthone ( $4,92 \pm 0,92$  mg/g Trockengewicht) als Sprosskulturen ( $3,38 \pm 0,43$  mg/g Trockengewicht) enthielten. Die *HpaBPS* wird stärker im Rindenparenchym von Wurzeln exprimiert. Im Gegensatz dazu wird das Gen sehr schwach in Sprosskulturen exprimiert. Daher stand fest, dass die Expression des *HpaBPS*-Gens eine Beziehung mit der Xanthon-Bildung und nicht der Hyperforin-Bildung hat.

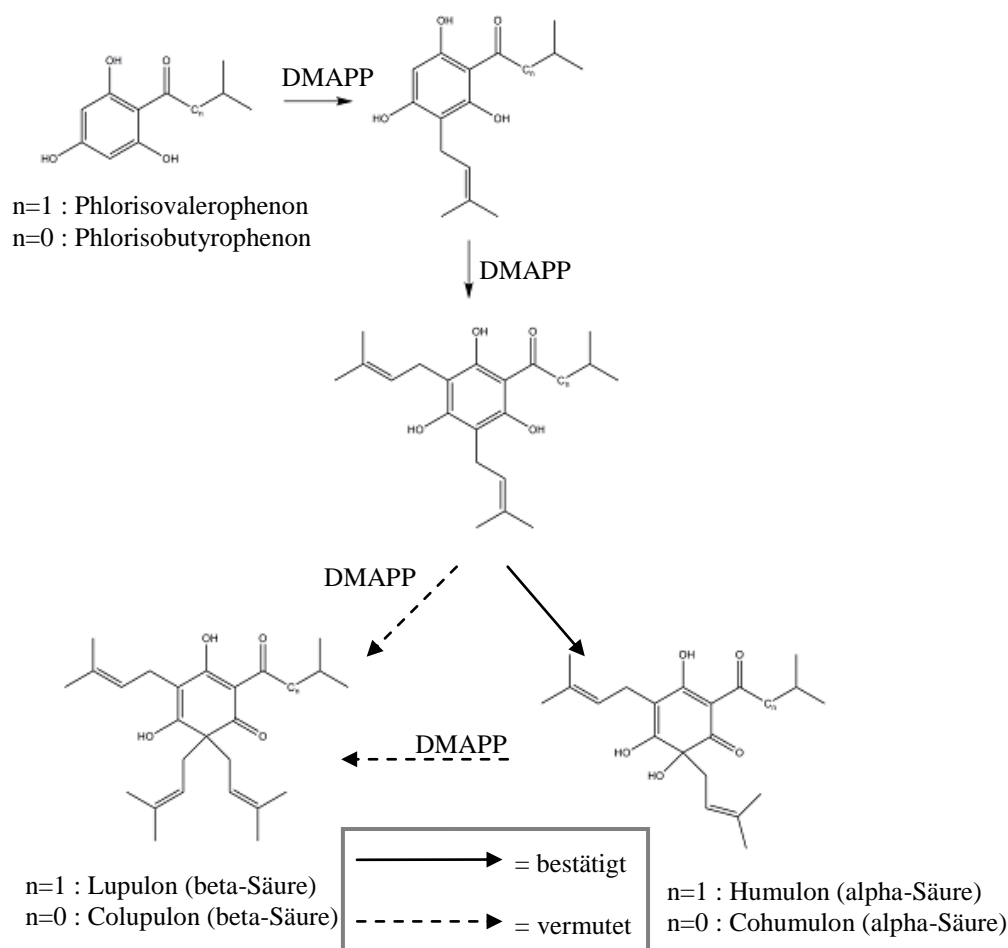
In Sprosskulturen wurden Phloroglucinderivate wie Hyperforin, Adhyperforin und Secohyperforin detektiert (Charchoglyan et al., 2007; Dukovčić, 2012). Nach Hölscher et al. (2009) wurde Hyperforin in durchscheinenden *H. perforatum*-Drüsen gefunden, d.h. dass das in den Drüsen gefundene Vorkommen der HpBUS-Transkripte eine Beziehung mit der Hyperforin-Biosynthese hat. Demzufolge scheint das neu klonierte Enzym eine BUS zu sein.

Das HpBUS-Transkript wurde auch in den Zellen der Bündelscheide exprimiert. Niemüller (2007) hat die Lokalisation der HSS (Homospermidin-Synthase), die das Eingangsenzym der Pyrrolizidin-Alkaloid (PA)-Biosynthese darstellt, in den jungen Blättern und Wurzeln von *Symphytum officinale* untersucht. Die Lokalisationsstudien ergaben eine Expression der HSS sowohl in den Zellen der Bündelscheide als auch in den Zellen der Endodermis. Interessanterweise wurde mit den Zellen der Bündelscheide ein zur Endodermis der Wurzel analoges Gewebe als Sitz der HSS identifiziert. Wie die Endodermis in den Wurzeln grenzt die Bündelscheide das Leitgewebe von den umgebenden Parenchymzellen ab und kontrolliert den Ein- und Ausstrom von Stoffen. Deswegen wird es sehr interessant die Lokalisierung der HpBUS in Wurzeln von *H. perforatum* zu untersuchen.

Ein der BUS funktionell ähnliches Enzym ist die Isovalerophenon-Synthase (VPS) aus *Humulus lupulus*. Sie wird ebenfalls in Drüsen, hier den Hopfendrüsen, exprimiert (Okada und Ito, 2001). Die *H. lupulus*-VPS ist an der Hopfenbitterstoff-Biosynthese beteiligt. Die vorkommenden Bittersäuren sind mehrfach prenylierte Phloroglucinole, ähnlich dem Hyperforin, aber nicht bizyklisch. Die entsprechenden Grundkörper werden bei der Biosynthese der  $\alpha$ -Säuren (Humulone) zweifach und bei den  $\beta$ -Säuren (Lupulone) dreifach prenyliert (Van Cleemput et al., 2009). Der erste und zweite Prenylierungsschritt verlaufen analog der Hyperforin-Biosynthese. Beide Prenylierungsschritte wurden in Proteinextrakten aus Hopfenknospen und jungen Hopfenzapfen detektiert (Zuurbier et al., 1998). Die verantwortliche Enzymaktivität ist löslich, abhängig von zweiwertigen Kationen und spezifisch für DMAPP, wobei noch nicht geklärt wurde, ob es sich um ein oder zwei

verschiedene Enzyme handelt. Damit werden die gleichen Eigenschaften wie bei der Prenyltransferase der Hyperforin-Biosynthese beobachtet (Abb. 5.8).

Interessanterweise ergaben auch die Mutationen I176V und T277P/I176V der HpBUS VPS-Aktivitäten, was die Beziehung zwischen den beiden Enzymen VPS und BUS belegt, die sowohl Isobutyryl-CoA als auch Isovaleryl-CoA akzeptieren und in Drüsen lokalisiert sind.



**Abb. 5.8:** Biosynthese von Bittersäuren im Hopfen (Zuurbier et al., 1998)

## 5.2 Klonierung von PKS aus *Hypericum calycinum*

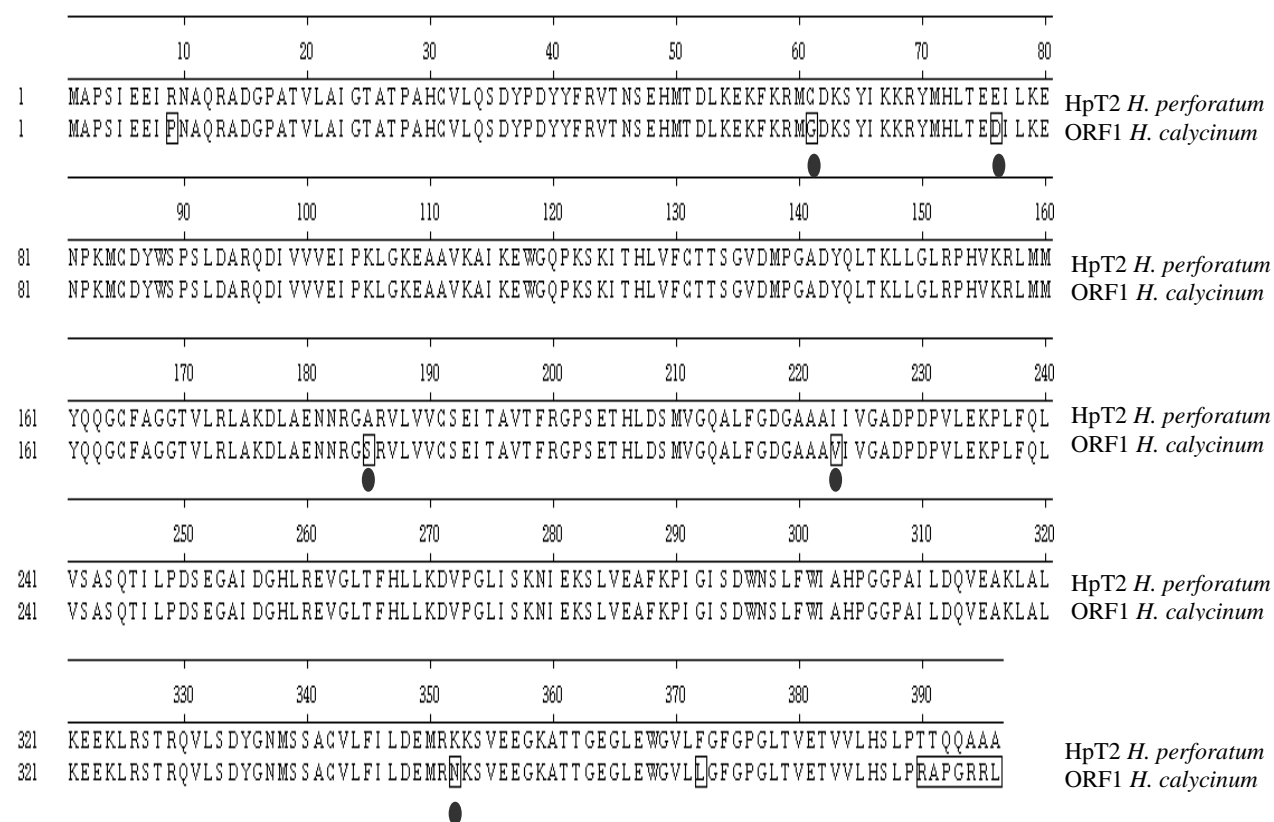
### 5.2.1 Klonierung des ORF1 aus *H. calycinum* –Knospen

Nach Meva Meva (2009) hatte HcORF1, der aus *H. calycinum*-Knospen kloniert wurde, eine Beziehung zur Hyperforin-Biosynthese. Es wurde vorgeschlagen, dass HcORF1 eine BUS ist.

*H. calycinum* enthält eine Anzahl von verwandten prenylierten Phloroglucinol-Derivaten (Decosterd et al., 1991; Gronquist et al., 2001). Sie sind in den Kronblättern, zusammen mit

Flavonoiden an der Ausbildung von UV-reflektierenden und UV-absorbierenden Zonen beteiligt (Gronquist et al., 2001). Darüber hinaus kommen sie in hoher Konzentration in der Wand des Fruchtknotens vor. Der Fruchtknoten-Inhalt ist dagegen nahezu frei von diesen Verbindungen. Dies weist darauf hin, dass die Phloroglucinol-Derivate sowohl Aufgaben der Anlockung als auch der Abwehr wahrnehmen. Die Biosynthese der dearomatisierten isoprenylierten Phloroglucinol-Derivate und der Hyperforine scheint ähnlich zu sein.

Basierend auf den Angaben von Gronquist et al. (2001) wurden *H. calycinum*-Knospen als mRNA-Quelle verwendet, um HcORF1 zu komplettieren und zu korrigieren. Im HcORF1 von Meva Meva (2009) fehlt das 5'Ende, das in dieser Arbeit erfolgreich ergänzt wurde. Der kodierende Bereich der HcORF1-mRNA umfasst 1189 Basenpaare, entsprechend 396 Aminosäuren und 43,43 kDa. Nach der Überexpression war dieses Enzym, das 89% Übereinstimmung mit CHS aus *Garcinia mangostana* hatte, inaktiv. Allerdings konnte mit Hilfe des HcORF1 eine neue Sequenz in einem Transkriptom gefunden werden (<http://medicinalplantgenomics.msu.edu/index.shtml>). Sie stammte aus *H. perforatum*-Blüten (HpT2). Die Sequenz hatte, wie HcORF1, 90% Identität mit CHS aus *G. mangostana*, war aber aktiv. Sie reagiert mit *p*-Cumaroyl-CoA, um Naringenin Chalkon zu bilden. Die Charakterisierung dieses Enzyms ist noch in Arbeit. Der Sequenzvergleich des HcORF1 mit HpT2 ergab eine Homologie auf Aminosäureebene von 97,5 %. Es besteht die Möglichkeit, Mutationen an den Positionen Gly61, Asp76, Ser185, Val223 und Asn352 in Richtung der HpT2 zu vollziehen (Abb. 5.9). Vielleicht kann man so feststellen, welche Aminosäuren für die HcORF1-Aktivität verantwortlich sind.

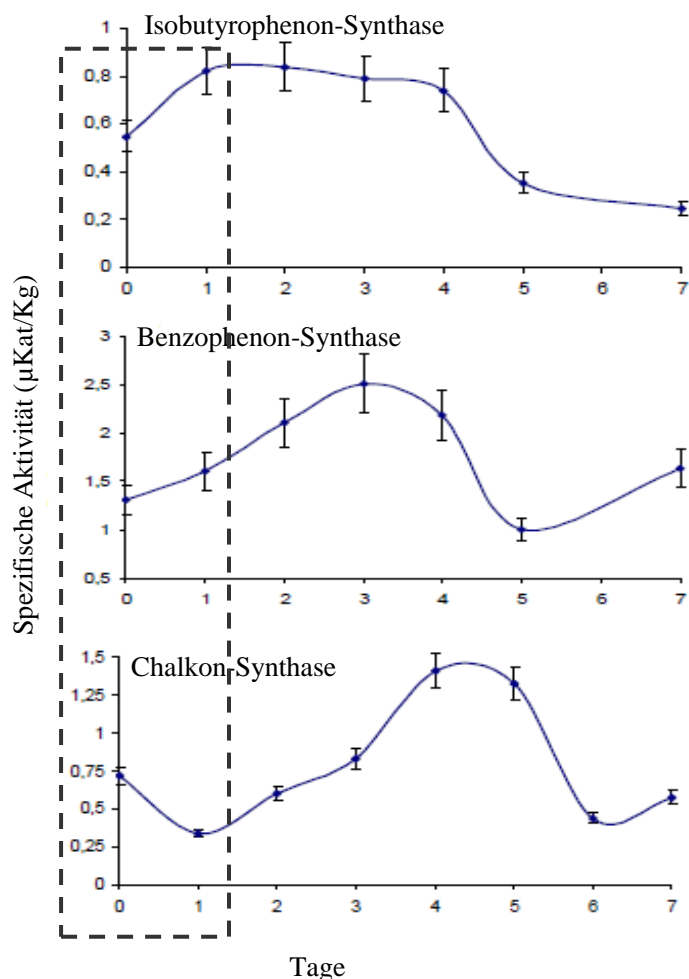


**Abb. 5.9:** Vergleich der Aminosäure-Sequenzen von HcORF1 und HpT2

5.2.2 PKS aus *Hypericum calycinum*-Zellkulturen

In *H. calycinum*-Zellkulturen sind Hyperforine (Klingauf et al., 2005) und Xanthone (Zodi, 2010; Gaid et al., 2012) detektiert worden. Sie sind beide Derivate des Polyketid-Stoffwechsels.

Klingauf (2004) hatte die Aktivitäten von drei Typ III PKS während des Zellkulturwachstums untersucht (Abb. 5.10). Die BUS-Aktivität stieg nach der Überimpfung der Zellen schnell an und erreichte ihr Maximum bereits am 2. Tag. Es folgte ein Plateau bis zum 4. Tag, wonach die Aktivität wieder abnahm. Die BPS- und CHS-Aktivitäten stiegen langsamer an und erreichten ihre Maxima am 3. bzw. 4.-5. Tag. Der schnelle BUS-Aktivitätsanstieg wurde als vorteilhaft für Klonierungsarbeiten angesehen. Deswegen wurden für die Klonierung der neuen PKS III, die mit BUS verwandt war, die Zellkulturen zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen 2 und 24 Stunden nach Überimpfung in frisches BDS Medium abgeerntet und als mRNA-Quelle genutzt.



**Abb. 5.10:** Veränderung der spezifischen Aktivitäten der Isobutyrophenon-Synthase, Benzophenon-Synthase und Chalkon-Synthase während des Wachstums von *H. calycinum*-Zellkulturen (aus Klingauf, 2004)

Schließlich wurden aus den Zellkulturen von *H. calycinum* zwei ORF amplifiziert: einer hatte 100%ige Identität mit HpPKS1 (Karpinnen et al., 2007) und einer hatte 100%ige Übereinstimmung mit HcORF1, aber beide ORFs waren auf Enzymebene inaktiv. Der kodierende Bereich der PKS1-mRNA aus *H. calycinum*-Zellkulturen umfasste 1161 Basen, entsprechend 386 Aminosäuren und 42,43 kDa. Karpinnen et al. (2007) hatten PKS1 aus *H. perforatum*-Blättern kloniert, aber diese war auch inaktiv. PKS1 wurde in *H. perforatum*-Knospen stärker exprimiert, deshalb haben Karpinnen et al. (2007) vorgeschlagen, dass dieses Enzym an der Hyperforin-Biosynthese beteiligt ist.



### 5.3 Enzym-Aktivität in *Hypericum perforatum* subsp. *angustifolium*-Zellkulturen

Die Enzym-Aktivitäten der BUS, BPS und CHS sind in *H. calycinum*-Zellkulturen untersucht worden (Klingauf, 2004). Die drei Enzyme katalysieren die Kondensation von einem Starter-Moleküle, entweder Isobutyryl-, Benzoyl- oder *p*-Cumaroyl-CoA mit drei Molekülen Malonyl-CoA um Phlorisobutyrophenon, Phlorbenzophenon bzw. Naringenin zu bilden. Die Enzym-Aktivitäten der BUS, BPS und CHS wurden außerdem in *H. perforatum* subsp. *angustifolium*-Zellkulturen untersucht. Zwei unterschiedliche Elizitoren wurden benutzt: BDS-Medium und Chitosan. BDS-Medium eliziert die Hyperforin-Bildung (Klingauf, 2004); Chitosan ist ein guter Elizitor von Xanthonen (Tocci et al., 2011). Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Klingauf (2004) kam es zur Bildung von Phlorisobutyrophenon bzw. Phlorbenzophenon. Aber es wurden keine Naringenin-Produkte mit den beiden Elizitoren detektiert. Es bleibt die Frage nach der Beziehung zwischen den beiden Enzymen BUS und BPS?

## 6 Zusammenfassung

- Die Biosynthese des Hyperforins kann in zwei Abschnitte gegliedert werden: erstens die Bildung des Grundgerüsts und nachfolgend die Prenylierungsreaktionen. Die Bildung des Grundgerüsts wird von der Isobutyrophenon-Synthase (BUS), einer Typ III-Polyketid-Synthase (PKS), katalysiert. Dieses Enzym kondensiert das aliphatische Startermolekül Isobutyryl-CoA mit drei Molekülen Malonyl-CoA zu einem intermediären Tetraketid, das im selben aktiven Zentrum zum Phlorisobutyrophenon zyklisiert wird.
- Eine mutmaßliche BUS-cDNA wurde aus *Hypericum perforatum*-Blüten kloniert und heterolog exprimiert. Das Enzym hatte als bevorzugtes Substrat Isobutyryl-CoA, als zweitbestes Benzoyl-CoA. Der  $K_m$ -Wert für Isobutyryl-CoA betrug 1,9  $\mu\text{M}$ . Der  $K_{\text{cat}}$ -Wert war 1,56  $\text{min}^{-1}$ , woraus sich ein  $K_{\text{cat}} / K_m$ -Koeffizient von 13684,2  $\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$  ergab. Im Gegensatz dazu betrug der  $K_m$ -Wert für Benzoyl-CoA 11,75  $\mu\text{M}$ . Der  $K_{\text{cat}}$ -Wert war obigem ähnlich (1,5  $\text{min}^{-1}$ ), woraus sich ein  $K_{\text{cat}} / K_m$ -Koeffizient von 2127,65  $\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$  errechnete.
- Die Identität der HpBUS mit schon klonierten Benzophenon-Synthasen (BPS) liegt zwischen 93 und 98 %. Die HpBUS unterscheidet sich von den BPS nur in drei Positionen. Einzel-, Doppel- und Tripel-Mutationen von HpBUS in Richtung der BPS wurden untersucht. Die Einzelmutteration I176V und die Doppelmutteration T277P/I176V ergaben eine Isovalerophenon-Synthase (VPS), die als Starter-Substrat Isovaleryl-CoA bevorzugte. Die Doppel-Mutante wurde charakterisiert. Der  $K_m$ -Wert für Isovaleryl-CoA betrug 6,5  $\mu\text{M}$ . Der  $K_{\text{cat}}$ -Wert war 2,2  $\text{min}^{-1}$ , woraus sich ein  $K_{\text{cat}} / K_m$ -Koeffizient von 5692,3  $\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$  ergab.
- Die zwei Doppelmutterationen T68I/T277P und T68I/I176V ergaben BUS-Enzyme, die höhere Aktivität mit Isobutyryl-CoA als der Wild-Typ aufwiesen. Sie unterschieden sich vom Wild Typ auch in der Substratspezifität, Stabilität und Ausbeute.
- Durch eine Tripelmutteration (T68I/I176V/T277P) konnte die HpBUS in eine BPS überführt werden. Die Tripelmutterante wurde charakterisiert. Der  $K_m$ -Wert für Benzoyl-CoA betrug 2,3  $\mu\text{M}$ . Der  $K_{\text{cat}}$ -Wert war 1,92  $\text{min}^{-1}$ , woraus sich ein  $K_{\text{cat}} / K_m$ -Koeffizient von 13913  $\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$  errechnete.
- Die Mutation T135L war inaktiv. Diese Mutation ergab aber eine Phenylpyron-Synthase, wenn sie in die HaBPS und die GmBPS eingeführt wurde.
- Mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung (ISH) konnte eine Lokalisierung von HpBUS-Transkripten in schizogenen Drüsen von *H. perforatum*-Sprosskulturen erzielt werden.

- Der ORF1 aus *Hypericum calycinum*-Knospen, der von Meva Meva (2009) kloniert worden war, wurde komplettiert und exprimiert. Das resultierende Enzym war aber inaktiv.
- Mit Hilfe degenerierter Primer, die von konservierten Regionen der Typ III-PKS abgeleitet waren, wurden zwei ORF aus *H. calycinum*-Zellkulturen kloniert. Der eine hatte 100%ige Identität mit HpPKS1 (Karppinen et al., 2007) und der zweite 100%ige Übereinstimmung mit dem ORF von Meva Meva (2009). Beide überexprimierten Enzyme waren inaktiv.
- In Zellkulturen von *H. perforatum* subsp. *angustifolium* wurden zwei PKS-Aktivitäten detektiert. Die Inkubationen von zellfreien Extrakten mit den Starter-Substraten Isobutyryl-CoA, Benzoyl-CoA und *p*-Cumaroyl-CoA in Gegenwart des Kettenverlängerers Malonyl-CoA führten zur Bildung von Phlorisobutyrophenon und Phlorbenzophenon, aber nicht zur Bildung von Naringenin.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abd El-Mawla A. M. A., Schmidt W., Beerhues L. (2001):** Cinnamic acid is a precursor of benzoic acids in cell cultures of *Hypericum androsaemum* L. but not in cell cultures of *Centaurium erythraea* RAFN. *Planta* 212, 288-293.
- Abd El-Mawla A. M. A. (2001):** Biosynthesis of benzoic acids in cell cultures of *Hypericum androsaemum* L. and *Centaurium erythraea* RAFN. *Dissertation*, Bonn.
- Abd El-Mawla A. M. A., Beerhues L. (2002):** Benzoic acid biosynthesis in cell cultures of *Hypericum androsaemum*. *Planta* 214, 727-733.
- Abou-Shoer M., Boettner F. E., Chang C.-J., Cassady J. M.;** Antitumor and cytotoxic xanthenes of *Psoralea corylifolia*. *Phytochemistry* 27, 2795 (1988)
- Abe T., Morita H., Noma H., Kohno T., Noguchi H., Abe I.;** Structure function analysis of benzalacetone synthase from *Rheum palmatum*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* in press (2007)
- Adam P., Arigoni D., Bacher A., Eisenreich W.;** Biosynthesis of Hyperforin in *Hypericum perforatum*. *J. Med. Chem.* 45: 4786-4793 (2002)
- Albert D., Zundorf I., Dingermann T., Muller W.E, Steinhilber D., Werz O.;** Hyperforin is a dual inhibitor of cyclooxygenase-1 and 5-lipoxygenase. *Biochem Pharmacol* 64: 1767-75 (2002)
- Alireza M.;** Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils of four *Hypericum* from Khorasan, Iran. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 6(12), pp. 2478-2487 (2012)
- Altschul S., Madden T., Schaffer A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.;** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25, 3389-3402 (1997)
- Agostinis P., Vantieghem A., Merlevede W., de Witte P.A.;** Hypericin in cancer treatment: more light on the way. *Int J Biochem Cell Biol.* 34: 221-241 (2002)
- Asgarpanah J.;** Phytochemistry, pharmacology and medicinal properties of *Hypericum perforatum* L. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* Vol. 6(19), pp. 1387-1394 (2012)
- Austin M. B., Noel J. P.;** The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Nat. Prod. Rep.* 20, 79-110 (2003)
- Austin M. B., Bowmann M. E., Ferrer J.-L., Schröder J., Noel J. P.;** An Aldol Switch Discovered in Stilbene Synthases Mediates Cyclization Specificity of Type III Polyketide Synthases. *Chemistry & Biology* 11: 1179-1194 (2004)
- Beerhues L.;** Hyperforin. *Phytochemistry* 67: 2201-7 (2006)

- Beerhues L.;** Biosynthesis of the Active *Hypericum perforatum* Constituents. *Review article*, (2010)
- Beerhues L., Berger U.;** Differential accumulation of xanthones in methyljasmonate- and yeast-extract-treated cell cultures of *Centaurium erythraea* and *Centaurium littorale*. *Planta* 197, 608-612 (1995)
- Beerhues L.;** Benzophenone synthase from cultured cells of *Centaurium erythraea*. *FEBS Lett.* 383, 264-266 (1996)
- Beerhues L., Liu B.;** Biosynthesis of biphenyls and benzophenones – Evolution of benzoic acid-specific type III polyketide synthases in plants. *Phytochemistry* 70, 1719-1727 (2009)
- Belkheir K. A.;** Immunofluorescence Localization of Polyketide Synthases in the Medicinal Plant *Hypericum perforatum*. . Dissertation, TU Braunschweig (2009)
- Bertoli A., Cirak C., Teixeira da Silva J. A.;** Hypericum species as sources of valuable essential oils. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnologie* (2011)
- Biber A., Fischer H., Romer A., Chatterjee S. S.;** Oral bioavailability of hyperforin from hypericum extracts in rats and human volunteers. *Pharmacopsychiatry* 31 Suppl 1: 36-43 (1998)
- Birnboim H. C., Doly J.;** A rapid alkaline extraction procedure for screening of recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* 7: 1513-1523 (1979)
- Bitsch R.;** Pflanzliche Phenole und ihre gesundheitliche Wirkung. *VitaMinSpur* 14: 16-20 (1999)
- Bennet G. J., Lee H. H.;** Xanthones from Guttiferae. *Phytochemistry*, 28: 967-998 (1989)
- Berger M., van Calker D.;** Affektive Störungen. In: Berger, M. (Hrsg.). Psychische Erkrankungen. Klinik und Therapie. München: Urban & Fischer (2004)
- Berghöfer R., Hölzl J.;** *Planta Med* 53, 216-217 (1987)
- Bezáková L., Psenák M., Kartnig T.;** Effect of dianthrone and their precursors from *Hypericum perforatum* L. on lipoxygenase activity. *Pharmazie* 54: 711 (1999)
- Boubakir Z., Beuerle T., Liu B., Beerhues L.;** The first prenylation step in hyperforin biosynthesis. *Phytochemistry* 66, 51-57 (2005)
- Bradford M. M.;** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54 (1976)
- Brattström A.;** Long-term effects of *St. John's wort* (*Hypericum perforatum*) treatment: A 1-year safety study in mild to moderate depression. *Phytomedicine* 16: 277-283 (2009)
- Butterweck V.;** Mechanism of action of *St. John's wort* in depression. *CNS Drugs* 17, 539-562 (2003)

- Bystrov N. S., Chernov B. K., Dobrynin V.N., Kolosov M. N.;** The structure of hyperforin. *Tetrahedron Lett.* 16, 2791-2794 (1975)
- Cervo L., Rozio M., Ekalle-soppo C. B., Cuiso G., Morazzonii P., Caccia S.;** Role of hyperforin in the antidepressant-like activity of *Hypericum perforatum* extracts. *Psychopharmacology* 164: 423-428 (2002)
- Ciccarelli D., Andreucci A. C., Pagni A. M.;** Translucent glands and secretory canals in *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae): Morphological, Anatomical and histochemical studies during the course of ontogenesis. *Annals of botany*, 8: 637-644 (2001)
- Charchoglyan A., Abrahamyan A., Fujii I., Boubakir Z., Gulder T. A. M., Toni M. Kutchan T. M., Hrachik Vardapetyan H., Bringmann G., Ebizuka Y., Beerhues L.;** Differential accumulation of hyperforin and secohyperforin in *Hypericum perforatum* tissue cultures. *Phytochemistry* 68, 2670–2677 (2007)
- Chatterjee S. S., Biber A., Weibezahn C.;** Stimulation of glutamate, aspartate and gamma-aminobutyric acid release from synaptosomes by hyperforin. *Pharmacopsychiatry* 34 Suppl 1: S11-9 (2001)
- Chericoni S., Testai L., Calderone V., Flamini G., Nieri P., Morelli I., Martinotti E.;** The xanthenes gentiacaulein and gentiakoichianin are responsible for the vasodilator action of the roots of *Gentiana kochiana*. *Planta Med* 69, 770-772 (2003)
- Clarke H., Flint J., Attwood A. S., Munafo M. R.;** Association of the 5-HTTLPR genotype and unipolar depression: a meta-analysis. *Psychol Med*, 1-12 (2010)
- Cohen S.N., Chang A. C. Y., Hsu I.;** Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 2110-2114 (1972)
- Crockett S. L., Wenzig E. V., Olaf Kunert O., Bauer R.;** Anti-inflammatory phloroglucinol derivatives from *Hypericum empetrifolium*. *Phytochem Lett.* Vol 1(1): 37–43 (2008)
- Cuesta Rubio O., Cuellar C. A., Rojas N., Valez Castro H., Rastrelli L., Aquino R.;** A polyisoprenylated benzophenone from Cuban propolis. *J. Nat. Prod.* 62: 1013-1015 (1999)
- Czygan, F. C.;** Kulturgeschichte und Mystik des Johanniskrautes. *Zeitschrift für Phytotherapie* 14, 272-278 (1993)
- Dagert M., Erlich D.;** Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* 6 :23-28 (1979)
- Dayu Yu, Fuchao Xu, Jia Zeng, Jixun Zhan;** Type III polyketide synthases in natural product biosynthesis, DOI: 10.1002/iub.1005; 64 (4): 285-295 (2012)
- Decosterd L. A., Stoeckli-Evans H., Chapuis J.-C., Msonthi J. D., Sordat B., Hostettmann K.;** New Hyperforin Derivatives from *Hypericum revolutum* VAHL with Growth-Inhibitory Activity against a Human Colon Carcinoma Cell Line. *Helvetica Chimica Acta* 72, 464-471 (1989)

- Decosterd L. A., Hoffmann E., Kyburz R., Bray D., Hostettmann K.;** A new phloroglucinol derivative from *Hypericum calycinum* with antifungal and in vitro antimalarial activity. *Planta Med.* 57 (6), 548-551 (1991)
- Denke A., Schempp H., Weiser D., Elstner E. F.;** Biochemical activities of extracts from *Hypericum perforatum* L. 5th Communication: Dopamine- $\beta$ -hydroxylase-product quantification by HPLC and inhibition by hypericins and flavonoids. *Arzneimittel-Forschung/ Drug Research* 2000; 50 (1): 415-419 (2000)
- DGE;** Deutsche Gesellschaft für Ernährung: Ernährungsbericht 2004, 325–346 Bonn (2004)
- DGE;** Deutsche Gesellschaft für Ernährung: Ernährungsbericht 2008, 335–346 Bonn (2008)
- Dukovčić I.;** Approaches to optimization of Hyperforin production in *Hypericum perforatum* shoot (Diplom-Arbeit) (2012)
- Ferrer J. L., Jez J. M., Bowman M. E., Dixon R. A., Noel J. P.;** Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis. *Nature Structural Biology* 6, 775-784 (1999)
- Feißt C., Pergola C., Rakonjac M., Rossi A., Koeberle A., Dodt G., Hoffmann M., Hoernig C., Fischer L., Steinhilber D., Franke L., Schneider G., Radmark O., Sautebin L., Werz O.;** Hyperforin is a novel type of 5-lipoxygenase inhibitor with high efficacy *in vivo*. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66, 2759-2771 (2009)
- Franklin G., Conceição L. F. R., Kombrink E., Dias A. C. P.;** Xanthone biosynthesis in *Hypericum perforatum* cells provides antioxidant and antimicrobial protection upon biotic stress. *Phytochemistry* 70, 60–68 (2009)
- Frohman M. A., Dush M. K., Martin G. R.;** Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85: 8998-9002 (1988)
- Fuchs L.;** Kräuterbuch, Basel 1543, Kapitel CCCXXII. Nachdruck Verlag Konrad Kölbl, München (1975)
- Fuller R. W., Blunt J. W., Boswell J. L., Cardellina II J. H., Boyd M. R.;** Guttiferone F, the First Prenylated Benzophenone from *Allanblackia stuhlmannii* *J. Nat. Prod.* 62: 130-133(1999)
- Gaid MM., Sircar D., Müller A., Beuerle T., Liu B., Ernst L., Hänsch R., Beerhues L.;** Cinnamate:CoA Ligase Initiates Biosynthesis of a Benzoate-Derived Xanthone Phytoalexin in *Hypericum calycinum* Cell Cultures. *Plant Physiology* pp 112.204180 (2012)
- Gastpar M., Singer A., Zeller K.;** Comparative Efficacy and Safety of a Once-Daily Dosage of *Hypericum* Extract STW3-VI and Citalopram in Patients with Moderate Depression: A Double-Blind, Randomised, Multicentre, Placebo-Controlled Study. *Pharmacopsychiatry* 39: 66-75 (2006)

- Groweiss A., Cardellina J. H., Boyd M. R.;** HIV-inhibitory prenylated xanthenes and flavones from *Maclura tinctoria*. *J Nat Prod* 63, 1537-1539 (2000)
- Greeson J. M., Sanford B., Monti D. A.;** *St. John's wort (Hypericum perforatum)*: a review of the current pharmacological, toxicological, and clinical literature. *Psychopharmacology* 153, 402-414 (2001)
- Gronquist M., Bezzerides A., Attygale A., Meinwald J., Eisner M., Eisner T.;** Attractive and defensive functions of the ultraviolet pigments of a flower (*Hypericum calycinum*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (24), 13745-13750 (2001)
- Guedes A. P., Amorim L. R., Vicente A., Fernandes-Ferreira M.;** Variation of the essential oil content and composition in leaves from cultivated plants of *Hypericum androsaemum* L. *Phytochemical Analysis*. 15: 146 – 151 (2004)
- Guo Y., Ma L., Ji Y., Pu G., Liu B., Du Z., Li G., Ye H., Wang H.;** Isolation of the 5'-end of plant gene by TATA-box Degenerate Primers polymerase chain reaction. *Mol Biotech* DOI 10.1007/s12033-010-9323-0 in press (2010)
- Hammer K. D. P., Hillwig M. L., Solco A. K. S., Dixon P. M., Delate K., Murphy P. A., Wurtele E. S., Birt D. F.;** Inhibition of prostaglandin E2 production by anti-inflammatory *Hypericum perforatum* extracts and constituents in RAW264.7 mouse macrophage cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 7323-7331 (2007)
- Hautzinger M.;** Depression. In J. Margraf (Hrsg.), *Lehrbuch der Verhaltenstherapie*. Band 2. S.121-133. Berlin: Springer (1996)
- Hay A.E., Helesbeux J.J., Duval O., Labaied M., Grellier P., Richomme P.;** Antimalarial xanthenes from *Calophyllum caledonicum* and *Garcinia vieillardii*. *Life Sci* 75, 3077-3085 (2004)
- Harborne J. B.;** *The flavonoids: Advances in research since 1986*, Chapman & Hall, London (1994)
- Hartmann T.;** From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 68, 2831-2846 (2007)
- Hartmann T., Ober D.;** Der pflanzliche Sekundärstoffwechsel: Biologische Notwendigkeit und pharmazeutischer Nutzen. *Carolo-Wilhelmina IBP TU Braunschweig*, 26-32 (2003)
- Hejátko J., Blilou I., Brewer P.B., Friml J., Scheres B., Benková E.;** In situ hybridization technique for mRNA detection in whole mount Arabidopsis samples. *Nature Protocols* 1: 1939-1946. doi:10.1038/nprot.2006.333 (2006)
- Hegi G.;** *Illustrierte Flora von Mitteleuropa* Bd . V, 498-520 Carl Hanser Verlag, München, (1970)
- Helariutta Y., Elomaa P., Kotilainen M., Griesbach R. J., Schroder J., Teeri T. H.;** Chalcone synthase-like genes active during corolla development are differentially expressed and encode enzymes with different catalytic properties in *Gerbera hybrida* (Asteraceae). *Plant Mol. Biol.* 28: 47-60 (1995)



- Hildebrand P. D., Jensen K. I. N.;** Potential for the biological control of *St. John's wort* (*Hypericum perforatum* L.) with an endemic strain of *C. T.* *Canadian Journal of Plant Pathology*, 13, 60-70 (1991)
- Hölscher D., Shroff R., Knop K., Gottschaldt M., Crecelius A., Schneider B., Heckel D. G., Schubert U. S., Svatos A.;** Matrix-free UV-laser desorption/ionization (LDI) mass spectrometric imaging at the single-cell level: distribution of secondary metabolites of *Arabidopsis thaliana* and *Hypericum* species. *The Plant Journal* 60, 907–918 (2009)
- Holton T. A., Graham M. W.;** A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using dTT-tailed vectors. *Nucl. Acids Research* 19: 1156 (1990)
- Hölzl J., Schütt H.;** Johanniskraut: eine Alternative zu synthetischen Antidepressiva? *Pharmaz. Zeitung* 46: 3959-3977 (1994)
- Höltje H. D., Walper A.;** "Molecular Modeling" zum antidepressiven Wirkmechanismus von *Hypericum*-Inhaltsstoffen. *Nervenheilkunde* 12: 339-340 (1993)
- Hölzl J., Petersen M.;** Chemical constituents of *Hypericum* ssp. In: Ernst E. (ed) *Hypericum-The genus Hypericum*. *Taylor & Francis*, London, pp 77-93 (2003)
- Isvett J. Flores-Sanchez, Robert Verpoorte;** Plant Polyketide Synthases: A fascinating group of enzymes. *Plant Physiology and Biochemistry* 47 167–174 (2009)
- Jakobi K., Hertweck C.;** A gene cluster encoding resistomycin biosynthesis in *Streptomyces resistomycificus*; Exploring polyketide cyclization beyond linear and angucyclic patterns. *Journal of the American Chemical Society* 126, 2298-2299 (2004)
- Jacobi F., Wittchen H. U., Holting C., Hofler M., Pfister H., Muller N., Lieb R.;** Prevalence, co-morbidity and correlates of mental disorders in the general population: results from the German Health Interview and Examination Survey (GHS). *Psychol Med*, 34(4), 597-611 (2004)
- Jensen A. G., Hansen S. H., Nielsen EØ.;** Adhyperforin as a contributor to the effect of *Hypericum perforatum* L. in biochemical models of antidepressant activity. *Life Sci* 68:1593–1605 (2001)
- Jez J. M., Noel J. P.;** Mechanism of chalcone synthase. pKa of the catalytic cysteine and the role of the conserved histidine in a plant polyketide synthase. *Journal of Biological Chemistry* 275, 39640-39646 (2000)
- Jez J. M., Austin M. B., Ferrer J.-L., Bowmann M. E., Schröder J., Noel J. P.;** Structural control of polyketide formation in plant-specific polyketide synthases. *Chemistry & Biology* 7: 919-930 (2000)
- John H. A., Birnstiel M. L., Jones K. W.;** RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 223: 582-587 (1969)

- Kalb R., Trautmann-Sponsel R. D., Kieser M.;** Efficacy and tolerability of hypericum extract WS 5572 versus placebo in mildly to moderately depressed patients. A randomized double-blind multicenter clinical trial. *Pharmacopsychiatry* 34: 96-103 (2001)
- Karppinen K., Hokkanen J., Tolonen A., Mattila S., Hohtola A.;** Biosynthesis of hyperforin and adhyperforin from amino acid precursors in shoot cultures of *Hypericum perforatum*. *Phytochemistry* 68, 1038–1045 (2007)
- Karppinen K., Hokkanen J., Mattila S., Neubauer P., Hohtola A.;** Octaketide-producing type III polyketide synthase from *Hypericum perforatum* is expressed in dark glands accumulating hypericins. *FEBS J* 275: 4329–4342 (2008)
- Kasper S., Anghelescu I. G., Szegedi A., Dienel A., Kieser M.;** Superior efficacy of St John's wort extract WS 5570 compared to placebo in patients with major depression: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multi-center trial [ISRCTN77277298]. *BMC Med* 4: 14 (2006)
- Kiyohara C., Yoshimasu K.;** Association between major depressive disorder and a functional polymorphism of the 5-hydroxytryptamine (serotonin) transporter gene: a meta -analysis. *Psychiatr Genet*, 20(2), 49-58 (2010)
- Klingauf P.;** Hyperforin-Biosynthese, Molekulare Analyse von Polyketid-Synthasen aus *Hypericum perforatum* und *Hypericum calycinum*. Dissertation, TU Braunschweig (2004)
- Klingauf P., Beuerle T., Mellenthin A., El-Moghazy S.A.M., Boubakir Z., Beerhues L.;** Biosynthesis of the hyperforin skeleton in *Hypericum calycinum* cell cultures. *Phytochemistry* 66, 2005, 139-145 (2005)
- Klundt T., Bocola M., Lütge M., Beuerle T., Liu B., Beerhues L.;** A single amino acid substitution converts benzophenone synthase into phenylpyrone synthase. *Journal of Biological Chemistry* 284, 30957-30964 (2009)
- Kornfeld A., Kaufman Peter B., Lu Casey R., Gibson Donna M., Bolling Steven F., Warber Sara L., Chang Soo Chul, Kirakosyan Ara;** The production of hypericins in two selected *Hypericum perforatum* shoot cultures is related to differences in black gland structure. *Plant Biology and Biochemistry* 45 24-32, (2007)
- Kokubun T., Harborne J. B.;** A survey of phytoalexin induction in leaves of the Rosaceae by copper ions. *Z. Naturforsch.* 49C, 628-634 (1994)
- Kokubun T., Harborne J. B.;** Phytoalexin induction in the sapwood of plants of the Maloideae (Rosaceae): Biphenyls or dibenzofurans. *Phytochemistry* 40, 1649-1654 (1995)
- Kreuzaler F., Hahlbrock K.;** Enzymatic synthesis of an aromatic ring from acetate units. Partial purification and some properties of flavanone synthase from cell-suspension cultures of *Petroselinum hortense*. *European Journal of Biochemistry* 56, 205-213 (1975)

- Kubin A., Wierrani F., Burner U., Alth G., Grunberger W.;** Hypericin-the facts about a controversial agent. *Current Pharmaceutical Design* 11, 233-253 (2005)
- Laemmli U. K.;** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685 (1970)
- Leuner K., Kazanski V., Mueller M., Henke B., Gollasch M., Harteneck C., Mueller W. E.;** Hyperforin-A key constituent of st. John's wort specifically activates TRPC6. *FASEB Journal*. 21: 4101-4111 (2007)
- Leuner K., Kraus M., Woelfle U., Beschmann H., Harteneck C., Boehncke W.-H., Schempp C. M., Mueller W. E.;** Reduced TRPC channel expression in psoriatic keratinocytes is associated with impaired differentiation and enhanced proliferation. *Plos ONE*.6 (2011)
- Leuner K., Li W., Amaral M. D., Rudolph S., Calfa G., Schuwald A. M., Harteneck C., Inoue T., Pozzo-Miller L.;** Hyperforin modulates dendritic spine morphology in hippocampal pyramidal neurons by activating  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable TRPC6 channels. *Hippocampus*. DOI 10.1002/hipo.22052 (2012)
- Liu B., Falkenstein-Paul H., Schmidt W., Beerhues L.;** Benzophenone synthase and chalcone synthase from *Hypericum androsaemum* cell cultures: cDNA cloning, functional expression, and site-directed mutagenesis of two polyketide synthases. *The Plant Journal* 34, 847-855 (2003)
- Liu B., Beuerle T., Klundt T., Beerhues L.;** Biphenyl synthase from yeast-extract- treated cell cultures of *Sorbus aucuparia*. *Planta* 218, 492-496 (2004)
- Łotocka B., Osinska E.;** Shoot anatomy and secretory structures in *Hypericum* species (Hypericaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 163, 70–86 (2010)
- Madabushi R., Frank B., Drewelow B., Derendorf H., Butterweck V.;** Hyperforin in St. John's wort drug interactions. *European Journal of Clinical Pharmacology* 62, 225-233 (2006)
- Maisenbacher P., Kovar K. A.;** Adhyperforin: a homologue of hyperforin from *Hypericum perforatum*. *Planta Med.* 58, 291-293 (1992)
- Mandel M., Higa A.;** Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.*, 53, 159-162 (1970)
- McKinnon M. C., Yucel K., Nazarov A., MacQueen G. M.;** A meta-analysis examining clinical predictors of hippocampal volume in patients with major depressive disorder. *J Psychiatry Neurosci*, 34(1), 41-54 (2009)
- Medina M.A., et al.;** Hyperforin: more than an antidepressant bioactive compound? *Life Sci.* 79(2): p. 105-11 (2006)
- Meva Meva W.;** Hyperforin-Biosynthese: cDNA Klonierung der Isobutyrophenon-Synthase aus *Hypericum perforatum* und *H. calycinum*. Dissertation, TU Braunschweig (2009)

- Martin C. R.;** Structure, function and regulation of the chalcone synthase. *International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology*, Vol 147, 233-284. Academic Press Inc, San Diego (1993)
- Melzer J., Bringnoli R., E. Keck M., Saller R.;** A Hypericum extract in the Treatment of Depression Symptoms in Outpatients: An Open Study. *Forsch Komplementmed*, 17: 7-14 (2010)
- Meruelo D., Lavie D., Lavie E.;** Therapeutic agents with dramatic antiretroviral activity and little toxicity at effective doses. Aromatic polycyclic diones hypericin and pseudohypericin. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:5230-5234 (1989)
- Middleton E., Kandaswami C., Theoharides T. C.;** The effect of plant flavonoids on mammalian cells: implication for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol. Rev.* 52, 673-651 (2000)
- Morel C., Seraphin D., Teyrouz A., Larcher G., Bouchara JP., Litaudon M., Richomme P., Bruneton J.;** New and antifungal xanthenes from *Calophyllum caledonicum*. *Planta Med* 68, 41-44 (2002)
- Moore L. B., Goodwin B., Jones S. A., Wisely G. B., Serabjit-Singh C., Willson T. M., Collins J. L., Kliewer S. A.;** St. John's wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (13), 7500-7502 (2000)
- Moter A., Göbel U. B.;** Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J. Microbiol. Methods* 41, 85-112 (2000)
- Morita H., Shimokawa Y., Tanio M., Kato R., Noguchi H., Sugio S., Kohno T., Abe I.;** A structure-based mechanism for benzalacetone synthase from *Rheum palmatum*. *Review article* (2009)
- Mullis K. B., Faloona F. A.;** "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." *Methods Enzymol* 155: 335-50 (1987)
- Müller A.;** Molekulare Analyse von Prenyltransferasen aus *Hypericum*-Arten. Dissertation, TU Braunschweig (2013)
- Müller W. E.;** Current St. John's wort research from mode of action to clinical efficacy. *Pharmacological Research* 47: 101-109 (2003)
- Müller W. E., Rolli M., Schäfer C., Hafner U.;** Effects of hypericum extract (LI 160) in biochemical models of antidepressant activity. *Pharmacopsychiatry* 30(Suppl 2):102-107 (1997)
- Müller W. E., Singer A., Wonnemann M., Hafner U., Rolli M., Schafer C.;** Hyperforin represents the neurotransmitter reuptake inhibiting constituent of hypericum extract. *Pharmacopsychiatry* 31(Suppl 1):16-21 (1998)
- Murashige T., Skoog F.;** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497 (1962)

- Naeem I., Saddige Z., Patel A. V., Hellio C.;** Flavonoid analysis and antibacterial activity of extracts of *Hypericum perforatum* Asian Journal of Chemistry 22, 3596-3600 (2010)
- Nakatani K., Nakahata N., Arakawa T., Yasuda H., Ohizumi Y.;** Inhibition of cyclooxygenase and prostaglandin E2 synthesis by gamma-mangostin, a xanthone derivative in mangosteen, in C6 rat glioma cells. *Biochem Pharmacol*, 63(1):73-9 (2002)
- Nahrstedt A., Butterweck V.;** Biologically active and other chemical constituents of the herb of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry* 30 (Suppl. 2): 129-134 (1997)
- Niemüller D. H.;** Vergleichende Lokalisation der Homospermidin-Synthase, Eingangsenzym der Pyrrolizidin-Alkaloid-Biosynthese, in verschiedenen Vertretern der Boraginaceae. Dissertation (2007)
- Nkengfack A.E., Mkounga P., Meyer M., Fomum Z. T., Bodo B.;** Globulixanthenes C, D and E: three prenylated xanthenes with antimicrobial properties from the root bark of *Symphonia globulifera*. *Phytochemistry* 61, 181-187 (2002)
- Okada Y., Ito K.;** Cloning and analysis of valerophenone synthase gene expressed specifically in lupulin gland of Hop (*Humulus lupulus* L.), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65 (1), 150-155 (2001)
- Olivo M., Du H. Y., Bay B. H.;** Hypericin lights up the way for the potential treatment of nasopharyngeal cancer by photodynamic therapy. *Current Clinical Pharmacology* 1, 217-222 (2006)
- Özgür Devrim Can and Ümide Demir Özkay;** Effects of *Hypericum montbretti* Extract on the Central Nervous System and Involvement of GABA/Benzodiazepine Receptors in its Pharmacological Activity. *Phytother. Res.* (2012)
- Öztürk Y.;** Testing the antidepressant effects of *Hypericum* species on animal models. *Pharmacopsychiatry* 30 Suppl. 2, 125-128 (1997)
- Pace N., Mackinney G.;** Hypericin, the photodynamic pigment from St. John's wort. *J. Am. Chem. Soc.* 63:2570-2574 (1941)
- Paniego N. B., Zuurbier K. W. M., Fung S.-Y., van der Heijden R., Scheffer J. J. C., Verpoorte R.;** Phlorisovalerophenone synthase, a novel polyketide synthase from hop (*Humulus lupulus* L.) cones. *Eur. J. Biochem.* 262, 612-616 (1999)
- Pardue M. L., Gall J. G.;** Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 64, 600-604 (1969)
- Perovic S., Müller W. E. G.;** Pharmacological profile of hypericum extract. Effect on serotonin uptake by postsynaptic receptors. *Arzneimittelforschung* 45:1145-1148 (1995)
- Pieper R., Luo G. L., Cane D. E., Khosla C.;** Cell free synthesis of polyketides by recombinant erythromycin polyketide synthases. *Nature* 378, 263-266 (1995)

- Rahimi R., Nikfar S., Abdollahi M.;** Efficacy and tolerability of *Hypericum perforatum* in major depressive disorder in comparison with selective serotonin reuptake inhibitors: a meta-analysis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33: 118-27 (2009)
- Rapaport M. H., Nierenberg A. A., Howland R., Dording C., Schettler P. J., Mischoulon D.;** The treatment of minor depression with St. John's Wort or citalopram: Failure to show benefit over placebo. *Journal of Psychiatric Research* 45, 931-941 (2011)
- Rauh W., Senghas K.;** Schmeil-Fitschen Flora von Deutschland und seinen angrenzenden Gebieten, Quelle & Meyer, Heidelberg (1976)
- Reichling J., Hostanska K., Saller R.;** Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.)-Vielstoffgemische kontraphtogene Einzelstoffe, *Forsch Komplementärmed Klass Naturheilkd* 10: 28-32 (2003)
- Reif H. J., Niesbach U., Deumling B., Saedler H.;** Cloning and analysis of two genes for chalcone synthase from *Petunia hybrida*. *Molecular and General Genetics* 199, 208-215 (1985)
- Reichling J., Weseler A., Saller R.;** A Current Review of the Antimicrobial Activity of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry* 34 (Suppl. 1), 116-118 (2001)
- Rothmaler W.;** Exkursionsflora von Deutschland, Verlag Volk und Wissen, Berlin (1970)
- Saddige Z., Naeem I., Maimoona A.;** A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L., *Journal of Ethnopharmacology* 131: 511-521 (2010)
- Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., Erlich H. A.;** "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* 239(4839): 487-91 (1988)
- Sambrook J., MacCallum P.;** Molecular cloning: a laboratory manual (3rd ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R.;** DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467 (1977)
- Scalbert A., Johnson I. T., Saltmarsh M.;** Polyphenols: Antioxidants and beyond. *Am J. Clin. Nutr.* 81, 215S-217S (2005)
- Schramm G., Bruchhaus I., Roeder T.;** A simple and reliable 5'-RACE approach. *Nucleic Acids Res* 28: 96e (2000)
- Schempp C. M., et al. ;** [St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). A plant with relevance for dermatology]. *Hautarzt*, 53(5): p. 316-21 (2002)
- Schempp C. M., Windeck T., Hezel S., Simon JC.;** Topical treatment of atopic dermatitis with St. John's wort cream--a randomized, placebo controlled, double blind half-side comparison. *Phytomedicine*. 10 Suppl 4:31-7 (2003)

- Schempp C. M., Pelz K., Wittmer A., Schöpf E., Simon J. C.;** Antibacterial activity of hyperforin from St. John's wort, against multiresistant *Staphylococcus aureus* and gram-positive bacteria. *The Lancet* 353, 2129 (1999)
- Schimmer O., Mauthner H.;** Polymethoxylated xanthenes from the herb of *Centaurium erythraea* with strong antimutagenic properties in *Salmonella typhimurium*. *Planta Med* 6, 561-564 (1996)
- Shi S. P., Morita H., Wanibuchi K., Noguchi H., Abe I.;** Enzymatic formation of unnatural novel polyketide scaffolds by plant-specific type III polyketide synthase. *Tetra. Lett.* 50, 2150-2153 (2009)
- Shi S. P., Wanibuchi K., Morita H., Endo K., Noguchi H., Abe I.;** Enzymatic formation of unnatural novel chalcone, stilbene, and benzophenone scaffolds by plant type III polyketide synthase. *Org. Lett.* 11. 551-554 (2009)
- Schmidt W., Beerhues L.;** Alternative pathways of xanthone biosynthesis in cell cultures of *Hypericum androsaemum* L. *FEBS Letters* 420, 143-146 (1997)
- Shomura Y., Torayama I., Suh D. Y., Xiang T., Kita A., Sankawa U., Miki K.;** Crystal structure of stilbene synthase from *Arachis hypogaea*. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* 60:803-806 (2005)
- Schrumpf G.;** Gentechnische Methoden. *Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg. Berlin* (2002)
- Schröder J.;** The chalcone/stilbene synthase-type family of condensing enzymes. *Comprehensive Natural Products Chemistry vol. 1, Elsevier, Amsterdam* 749-771 (1999)
- Schröder F.;** Induzierte chemische Abwehr bei Pflanzen. *Angew. Chemie* 110 (9), 1271-1274 (1998)
- Schröder G., Brown J. W., Schröder J.;** Molecular analysis of resveratrol synthase. cDNA, genomic clones and relationship with chalcone synthase. *Eur. J. Biochem.* 172: 161-169 (1988)
- Schröder J.;** A family of plant-specific polyketide synthases: facts and predictions. *Trends in plant Science* 2 (10), 373-378 (1997)
- Schulz V.;** Neue Therapiestudien und Metaanalysen; Johanniskrautextrakte vs. Synthetika. *Pharm. Unserer Zeit* 3, 228-234 (2003)
- Scotto-Lavino E., Du G., Frohman M.A.;** Amplification of 5' end cDNA with 'new RACE'. *Nat Protoc* 1: 3056-3061 (2006)
- Sen S., Burmeister M., Ghosh D.;** Meta-analysis of the association between a serotonin transporter promoter polymorphism (5-HTTLPR) and anxiety-related personality traits. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 127B(1), 85-89 (2004)
- Sielmann E. H., Creasy L. L.;** Concentration of phytoalexin resveratrol in wine. *Am J. Enol. Vitic.* 43: 49-52 (1992)

- Singer A., Wonnemann M., Müller WE.;** Hyperforin, a major antidepressant constituent of St. John's Wort, inhibits serotonin uptake by elevating free intracellular Na<sup>+</sup>. *J Pharmacol Exp Ther* 290:1363–1368 (1999)
- Soelberg J., Jorgensen L. B., Jäger A. K.;** Hyperforin Accumulates in the Translucent Glands of *Hypericum perforatum*. *Annals of Botany* 99: 1097–1100 (2007)
- Suzuki O., Katsumata Y., Oya M., Bladt S., Wagner H.;** Inhibition of monoamine oxidase by hypericin. *Planta Med* 50, 272-274 (1984)
- Suzuki O., Katsumata Y., Oya M., Chari V. M., Vermes B., Wagner H., Hostettmann K.;** Inhibition of type A and type B monoamine oxidases by naturally occurring xanthenes. *Planta Med* 42, 17-21 (1981)
- Tekelova D., Repcak M., Zemkova E., Toth J.;** Quantitative Changes of Dianthrone, Hyperforin and Flavonoids Content in the Flower Ontogenesis of *Hypericum perforatum*. *Planta Med.* 66, 778-780 (2000)
- Thull U., Testa B.;** Screening of unsubstituted cyclic compounds as inhibitors of monoamine oxidases. *Biochemical Pharmacology* 47: 2307-2310 (1994)
- Tocci N., Simonetti G., Diodata D'Auria F., Panella S., Palamara A. T., Valletta A., Pasqua G.;** Root cultures of *Hypericum perforatum* subsp. *angustifolium* elicited with chitosan and production of xanthone-rich extracts with antifungal activity. *Appl Microbiol Biotechnol* 91:977–987 (2011)
- Tocci N., Diodata D'Auria F., Simonetti G., Panella S., Palamara A. T., Pasqua G.;** A three-step culture system to increase the xanthone production and antifungal activity of *Hypericum perforatum* subsp. *angustifolium* in vitro roots. *Plant Physiology and Biochemistry* 54-58 (2012)
- Tocci N.;** Study of xanthone biosynthesis in planta and in vitro systems of H. perforatum subsp. *angustifolium*. Dissertation, "Sapienza" University of Rome (2012)
- Treiber K., Singer A., Henke B., Müller W. E.;** Hyperforin activates nonselective cation channels (NSCCs). *Br J Pharmacol* 145: 75-83 (2005)
- Tropf S., Karcher B., Schröder G., Schröder J.;** Reaction mechanisms of homodimeric plant polyketide synthases (stilbene and chalcone synthase) - a single active site for the condensing reaction is sufficient for synthesis of stilbenes, chalcones and 6'-deoxychalcones. *Journal of Biological Chemistry* 270, 7922-7928 (1995)
- Tschierch A.;** Handbuch der Pharmakognosie, 2. Auflage, Band 1.3, 1292 (1933)
- Ullah Khan A., Gilani A. H., Rehman N.;** Pharmacological studies on *Hypericum perforatum* fractions and constituents. *Pharmaceutical Biology*, 49 (1): 46-56 (2011)
- Umek A., Kreft S., Kartnig T., Heydel B.;** Quantitative phytochemical analyses of six hypericum species growing in slovenia. *Planta Med* 65: 388-90 (1999)
- Upton R.;** St. John's wort (*Hypericum perforatum*): Quality control, analytical and therapeutic monograph. *American herbal pharmacopoeia and therapeutic compendium* (1997)



- Van Cleemput M., Cattoor K., De Bosscher K., Haegeman G., De Keukeleire D., Heyerick A.;** Hop (*Humulus lupulus*)-Derived Bitter Acids as Multipotent Bioactive Compounds. *Journal of Natural Products* 72: 1220-1230 (2009)
- Vandenbogaerde A. L., Delaey E. M., Vantiegem A. M., Himpens B. E., Merlevede W. J., De Witte P. A.;** Cytotoxicity and antiproliferative effects of hypericin and derivatives after photosensitization. *Photochem Photobiol.* 67, 119-125 (1998)
- Wichtel M.;** Monographie-Entwurf „*Hypericum perforatum* L.“ für das Bundesgesundheitsamt Berlin, Marburg (1983)
- Wittchen H. U., Moller H. J., Vossen A., Hautzinger M., Kasper S., Heuser I.;** Depression: Wege aus der Krankheit. *Karger Publishers* (1995)
- Wonnemann M., Singer A., Müller W.E.;** Inhibition of synaptosomal uptake of 3H-L - glutamate and 3H-GABA by hyperforin, a major constituent of St. John's Wort. The role of amiloride sensitive sodium conductive pathways. *Neuropsychopharmacology* 23:188–197 (2000)
- Yamazaki Y., Suh D. Y., Sitthithaworn W., Ishiguro K., Kobayashi Y., Shibuya M., Ebizuka Y., Sankawa U.;** Diverse chalcone synthase superfamily enzymes from the most primitive vascular plant *Psilotum nudum*. *Planta* 214, 75-84 (2001)
- Youdim K. A., Spencer J. P. E., Schroeter H., Rice-Evans C.;** Dietary flavonoids as potential neuroprotectants. *Biol. Chem.* 333, 503-519 (2002)
- Zapletalová P.;** Untersuchungen zum Vorkommen von Hyperforin und Adhyperforin in Zellkulturen verschiedener *Hypericum*-Arten. Diplomarbeit, Bonn (1999)
- Zobayed S. M. A., Afreen F., Goto E., Kozai T.;** Plant-environment interactions: accumulation of hypericin in dark glands of *Hypericum perforatum*. *Annals of Botany* 98: 793-804 (2006)
- Zodi R.;** Molecular cloning of benzophenone synthase from *Hypericum calycinum* cell cultures and attempts toward transformation of *Hypericum perforatum*. Dissertation, TU Braunschweig (2011)
- Zuurbier K. W. M., Fung S-Y., Scheffer J. J. C., Verpoorte R.;** In-vitro prenylation of aromatic intermediates in the biosynthesis of bitter acids in *Humulus lupulus*. *Phytochemistry* 49 (8), 2315-2322 (1998)
- Szegedi A., Kohnen R., Dienel A., Kieser M.;** Acute treatment of moderate to severe depression with hypericum extract WS 5570 (St John's wort): randomised controlled double blind non-inferiority trial versus paroxetine. *BMJ* 330: 503 (2005)
- Zobel A., Maier W.;** [Endophenotype--a new concept for biological characterization of psychiatric disorders]. *Nervenarzt*, 75(3), 205-214 (2004)

**Nukleotidsequenz der HpBUS**

ATGGCGCCTGCTATGGAATACTCAACCCAGAACGGCCAGGGGGGAGGAAAGAA  
GAGGGCTAGTGTCTCGCTATTGGAACGACCAACCCGGAGCACTTCATCTTGCA  
GGAAGAATACCCAGATTTCTACTTCAGGAACACTAACAGCGAACACATGACCG  
ATCTCAAGGAGAAGTTCAAGCGTATATGTGTTAAGTCTCATACTAGGAAGAGGC  
ACTTCTACCTGACGGAGGAGATCCTCAAGGAGAACCAAGGCATCGCCACCTAC  
GGCGCCGGCTCCCTCGACGCCCGCCAGAGGATCCTTGAGACTGAGGTCCCCAAG  
CTCGGACAAGAGGCGGCCCTCAAGGCCATCGCGGAGTGGGGCCAACCCATCTC  
CAAGATCACCCACGTTGTGTTCGCTACGACCTCCGGGTTCATGATGCCAGGCGC  
GGACTACGCCATCACCCGACTTCTCGGCCTCAACCGGACCGTCAGGCGCGTGAT  
GCTCTACAACCAGGGCTGCTTTGCTGGGGGACGGCTCTCCGTATCGCCAAGGA  
CCTCGCCGAGAACAACGAGGGTGCGCGTGTGCTGGTCGTGTGCGCGGAGAATA  
CCGCCATGACATTCCACGCGCCCAACGAGTCCCACCTCGACGTCATCGTGGGCC  
AGGCCATGTTCTCCGATGGTGCGGCCGCTCTGATCATCGGGGCGGGTCCCGACG  
CTGCCTCGGGGGAGCGCGCAGTGTTCAATATCCTGTCGGCGAGCCAGACGATCG  
TGCCGGGTTCGGACGGGGCGATAACGGCGCACTTTTACGAGATGGGGATGAGC  
TACTTCCTAAAGGAGGACGTCATTACTCTCTTCAGGGACAACATCGCCGCCGTC  
ATGGAGGAGGCCTTCTCCCCTCTTGGTGTCTCCGACTGGAACCTCCCTCTTCTACT  
CCATCCACCCCGGCGGCCGTGGCATCATCGACGGCGTCGCCGGCAACCTAGGG  
ATCAAGGACGAGAACCTTGTGGCCACCAGGCACGTCCTCGGCGAGTACGGCAA  
CATGGGGTCGGCCTGCGTGATGTTTCATCCTGGACGAGCTCAGGAGGAGCTCCAA  
GCTCAACGGGAAGCCCACCACCGGCGACGGCAAGGAGTTCGGCTGCCTCATCG  
GCCTCGGCCCTGGCCTCACTGTCTGAGGCCGTCGTCCTTCAGGGTGTCTGGGATCC  
TGCACTAG

**Aminosäuresequenz der HpBUS**

MAPAMEYSTQNGQGGGKKRASVLAIGTTNPEHFILQEEYPDFYFRNTNSEHMTDL  
KEKFKRICVKSHTKRHFYLTEEILKENQGIATYGAGSLDARQRILETEVPKLGQEA  
ALKAIAEWGQPISKITHVVFATTSGFMMPGADYAITRLLGLNRTVRRVMLYNQGC  
AGGTALRIAKDLAENNEGARVLVCAENTAMTFHAPNESHLDVIVGQAMFSDGAA  
ALIIGAGPDAASGERAVFNILSASQTIVPGSDGAITAHFYEMGMSYFLKEDVITLFRD  
NIAAVMEEAFSPLGVSDWNSLFYSIHPGGRGIIDGVAGNLGIKDENLVATRHLGEY  
GNMGSAACVMFILDELRRSSKLNGKPTTGDGKEFGCLIGLGPGLTVEAVVLQGVGIL  
H

**Nukleotidsequenz der HcORF1**

AATATCTAANTACGAGCCCTCTCACTCTCCACATCCCAATAGCCAAACCAAACC  
AAACAGACCAACCTTCTACACACAGAATCAAAAAGCCAGTCAAGAAATATCAT  
ATAATATGGCACCCTCCATCGAGGAGATCAGGAATGCCCAGAGGGCAGATGGC  
CCCGCCACCGTGCTCGCCATCGGCACCGCCACCCCGGCTCACTGCGTCCTCCAA  
TCCGAGTACCCCGACTATTACTTCCGCATTACCAACAGCGAGCACATGACCGAC  
CTCAAAGAAAAGTTCAAGCGCATGTGTGACAAGTCGTACATTAAGAAGCGGTA  
CATGCACCTGACGGAGGAGATCCTCAAGGAGAACCCTAAGATGTGCGACTACT  
GGTCGCCGACCCTCGACGCCCCGGCAGGACATCGTCGTGGTGGAGATCCCCAAG  
CTCGGGAAGGAGGCGGCCGTGAAGGCGATCAAGGAGTGGGGGCAGCCCAAGTC  
CAAGATCACTCACCTCGTCTTCTGCACCACCTCCGGCGTCGACATGCCCGGCGC  
CGACTACCAGCTCACCAAGCTCCTCGGCCTCCGSCCSCAYKATRATCGMATTAT  
GATGTA<sub>t</sub>CAGCAAGGGTGTTTCGCCGGCGGCACCGTCCTCCGCCTTGCCAAGGA  
TCTCGCTGAGAACAACCGCGGTGCCCGCGTCCTCGTAGTTTGCTCCGAGATCAC  
GGCTGTCACCTTCCGAGGGCCCCTCCGAGACCCACCTCGACTCCATGGTCGGTCA  
GGCCCTCTTTGGGGACGGAGCTGCCGCGATCATCGTGGGGGGCCGACCCGGACCC  
GGTCCTCGAGAAACCCCTCTTCCAGCTCGTCTCCGCATCGCAGACCATCCTCCC  
GGACTCGGAAGGGGGCCATTGACGGCCACCTGAGGGAGGTGGGCCTCACCTTCC  
ACCTGCTAAAGGACGTGCCAGGGGCTCATCTCTAAAAACATAGAGAAGAGTTTG  
GTGGAGGCGTTCAAGCCCATAGGGATCAGCGACTGGAACCTCCCTCTTCTGGATC  
GCCACCCCGGCGGAATCGCCATCCTGGACCAGGTTGAAGCCAAGCTCGCCCTC  
AAGGAGGAGAAGCTGAGGTCCACCCGACAAGTGCTCAGCGGTTACGGGAACAT  
GTCGAGCGCCTGCGTGCTGTTTATACTTGATGAGATGAGGAACAAGTCCGTCGA  
GGAAGGGAAGGCCACCACCGGAGAGGGGCTCGAGTGGGGCGTCCTCTTAGGGT  
TCGGACCCGGCCTCACCGTCGAGACCGTCGTCCTCCACAGTCTTCCCACCCACC  
AGGCCGCGCCTAGATAAACAATTTCTCTCTTCTTCTTCTTCTTTTTTGTC  
TTCAATCTTGCTTGGAACACTACATCGTGTGTGGTATATTTATTTAATTATAAAA  
TGGGATATTTTTTACCATTAAATATTTAAAAACGTTATGTGGCCTTGTTTTCCAAT  
ATTAATTATTCGTGTCATATTTGTGGGTAAAAA  
AAAAAA

**Aminosäuresequenz der HcORF1**

MAPSIEEIRNAQRADGPATVLAIGTATPAHCVLQSDYPDYYFRVTNSEHMTDLKEK  
FKRMGDKSYIKKRYMHLTEDILKENPKMCDYWSPSLDARQDIVVVEIPKLGKEAA  
VKAIKEWGQPKSKITHLVFCTTSGVDMPGADYQLTKLLGLRPHVKRLMMYQQGCF  
AGGTVLRLAKDLAENNRGSRVLVVCSEITAVTFRGPSETHLDSMVGQALFGDGAA  
AVIVGADPDPVLEKPLFQLVSASQTILPDSEGAIDGHLREVGLTFHLLKDVPGLISK  
NIEKSLVEAFKPIGIGDWNLSLFWIAHPGGPAILDQVEAKLALKEXKLRSTRQVLSDYG  
NMXSACVLFILDEMNRNKSVEEGKATTGEGLEWGVLLGFGPGLTVETVVLHSLPTH  
QAAA

**Nukleotidsequenz der HcPKS1**

ATGTCTAACTTGGAGACCAATGGCTCTTCGAGGAATGGCCACGCACCCACTCCG  
GGGAAGGCGACAGTTCTTGCTATGGGCAAGGCCTTCCCGAAGCAGCACGTTCCG  
CAGGAATGCTTGGTGGAGAAATTTATCAGCGACACCAAGTGCACGGACGCTGC  
CATCAAGGAGAAGCTGGAGCGACTTTGCGAAACCACAACCTGTGAAGACAAGGT  
ACACGGTTATGTGCAAAGAGGTCCTGGACAAGTACCCTGAGCTTGCTGTTGAAG  
GGTCCCCGACGATCAGGCAGAGGTTTCGAGATTGCGAATTCGGCTGTGGTCGAG  
ATGGCTATTGAAGCTAGCCACGCCTGCATCAAGGAATGGGGAAGGCCGATTAG  
TGAGATCACTCATGTTCGTGTACGTCTCATCCAGTGAGCTCCGGTTACCGGGCGG  
TGACCTTTACCTTGCCAGCGAGCTCGGCCTGAGGACCGATGTTTCGTGCGTGAT  
GCTCTATTTCTTAGGCTGTTACGGTGGTGTACGGGCCTGAGAGTCGCCAAGGA  
CATAGCGGAGAACAAATCCGGGGAGCCGTGTTCTGCTAACCACCTCTGAGACAA  
CAATACTGGCGTTCCGCCCCGCCAAGCACTGCTCGGCCTTACGACCTCGTAGGAG  
CTGCACTCTTCGGTGATGGAGCGGCCGCTGTGATCATCGGCACGAACCCTGTCA  
CAGGCAAGGAGTCCCCTTTCATGGAGCTGAATTACGCAACTCAGCAATTCCTTC  
CGGGAACACAGAGCATAGTCGACGGGAAGCTCCACGAGGAGGGAATAAACTTC  
AAGCTCGGGAGGGACCTTCCTCAGAAGATCGAAGACAACATTGAGGAGTTCTG  
CAAGAAGATCATGTCCGAAGCTGGTCTGACTCAGTTCAACGACCTGTTCTGGGC  
TGTCCATCCGGGCGGACCGGAGATACTCAACCGGGTCGAGAGCCGGCTCGGAT  
TGAACGCAGACAAGCTGGAATGCAGCAGAAGGGCGCTGGTGGACTTCGGGAAT  
GTGAGCAGCAACACAGTGTCTATGTAATGGAGTACTTGCGAGAGGAGCTGAA  
GAGAAAGGGATCAGAGGAATGGGGACTGGCTTTGGCTTTTGGTCCTGGCATTAC  
CTTTGAAGGAGTCCTTCTTCGAAGCCTATGCCTATGA

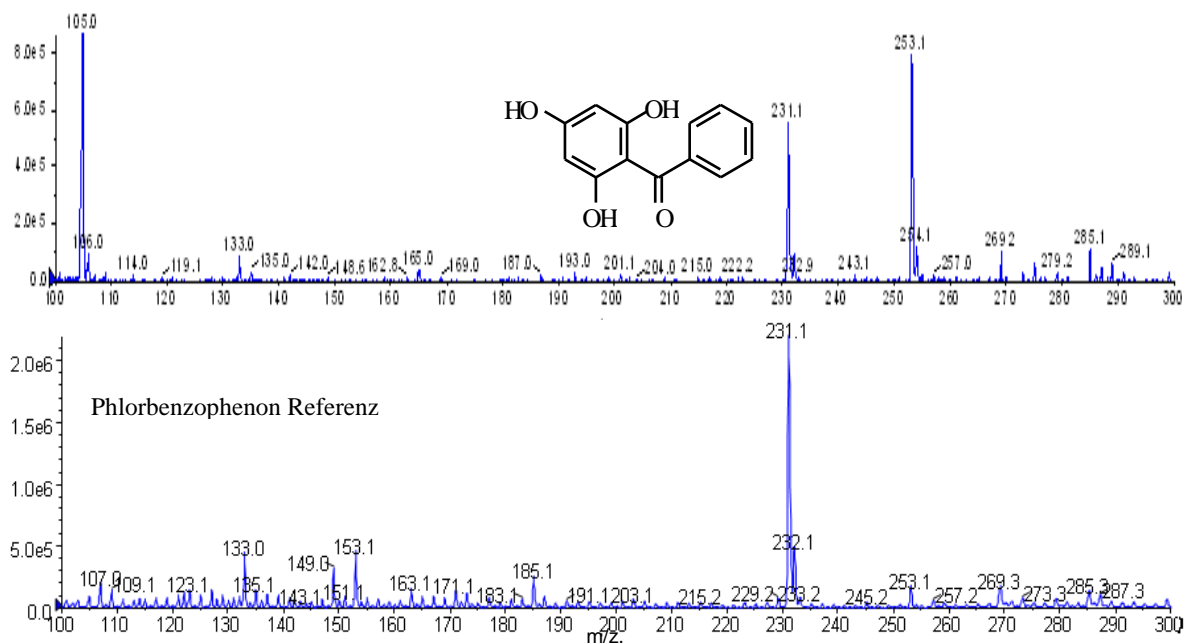
**Aminosäuresequenz der HcPKS1**

MSNLETNGSSRNGHAPTPGKATVLAMGKAFPKQHVPQECLVEKFISDTKCTDAAIK  
EKLERLCETTTVKTRYTVMCKEVLDKYPELAVEGSPTIRQRFEIANSAVVEMAIEAS  
HACIKEWGRPISEITHVVYVSSSELRLPGGDLYLASELGLRTDVRRVMLYFLGCG  
GVTGLRVAKDIAENNPGRVLLTTSETTILAFRPPSTARPYDLVGAALFGDGAAAVII  
GTNPVTGKESPFMELNYATQQFLPGTQSIVDGKLHEEGINFKLGRDLPQKIEDNIEEF  
CKKIMSEAGLTQFNDLFWAVHPGGPEILNRVESRLGLNADKLECSRRALVDFGNVS  
SNTVFYVMEYLREELKRKGSEEWGLALAFGPGITFEGVLLRSLCL

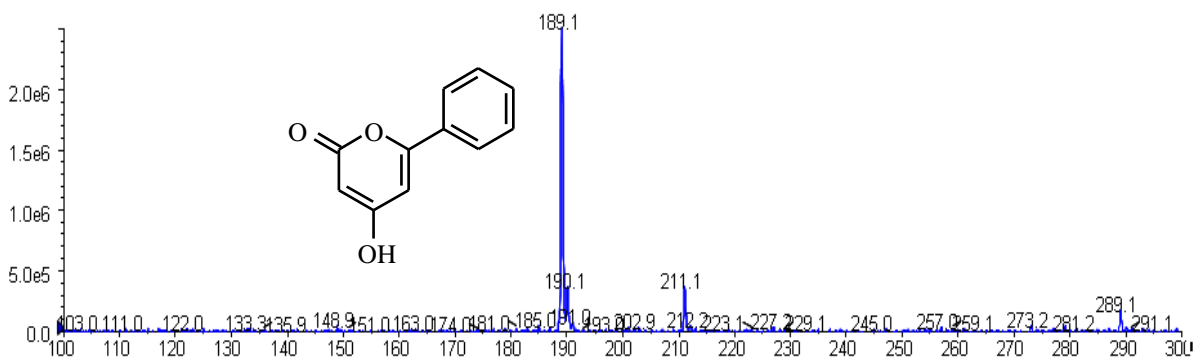
**Massenspektrometrische Vermessung der Produkte der Tripelmutante mit verschiedenen Starter-Substraten:** Benzoyl-CoA (a); Isobutyryl-CoA (b); Isovaleryl-CoA (c); Butyryl-CoA (d); Hexanoyl-CoA (e) und Octanoyl-CoA (f)

a)

❖ Phlorbenzophenon (m/z: 231)

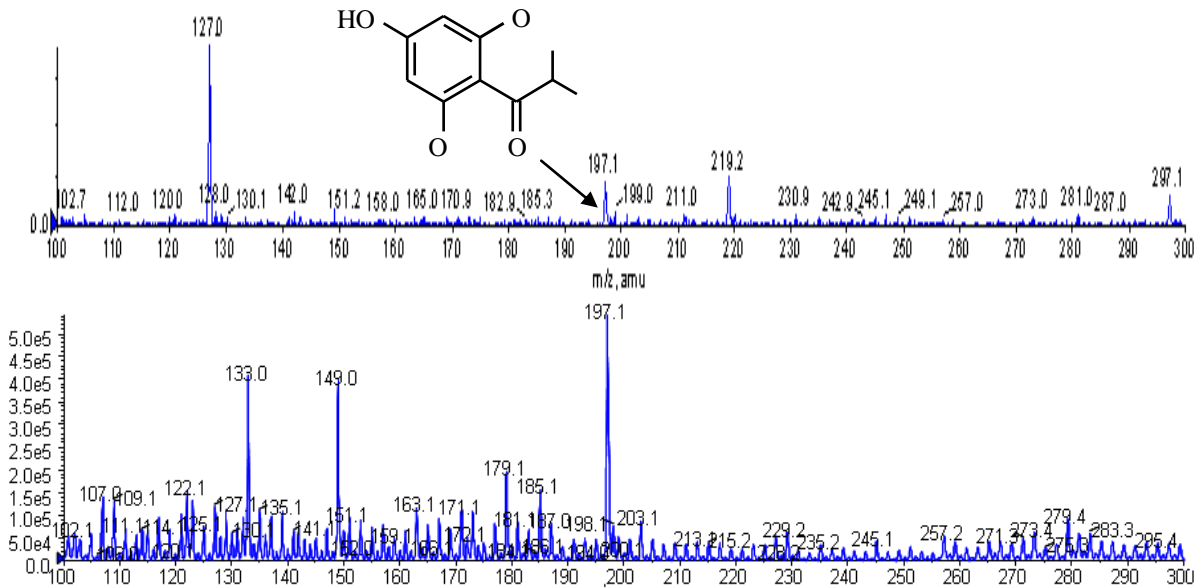


❖ 4-Hydroxy-6-phenylpyran-2-on (m/z: 189)

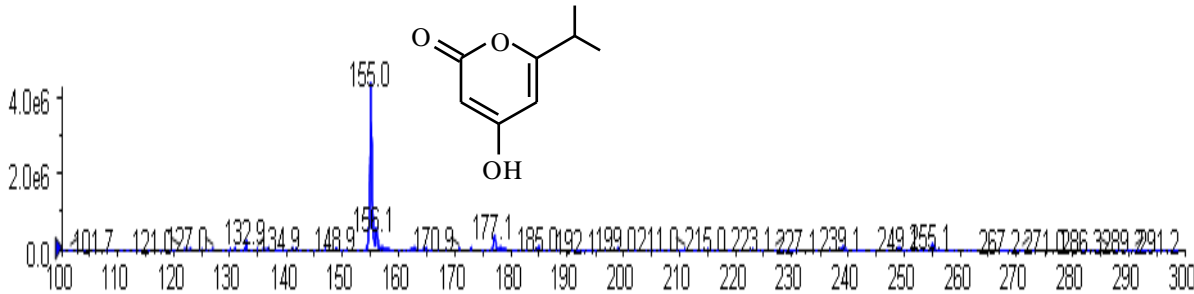


b)

❖ Phlorisobutyrophenon (m/z : 197)

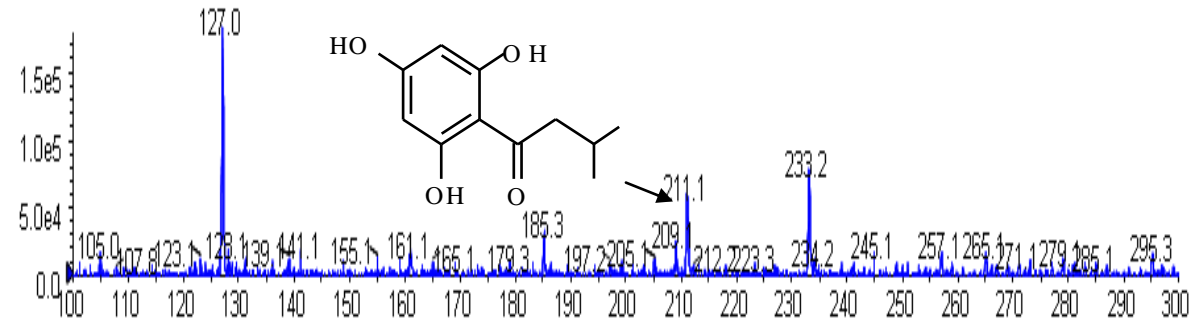


❖ 4-Hydroxy-6-isopropyl-pyran-2-on (m/z : 155)

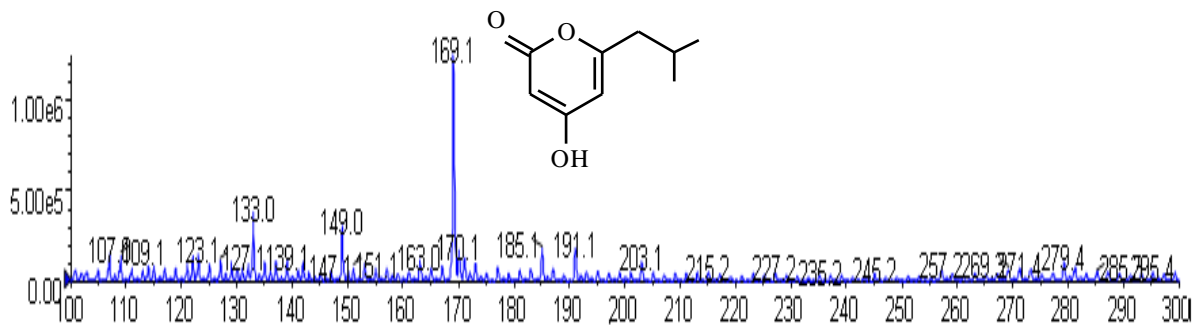


c)

❖ Phlorisovalerophenon (m/z: 211)

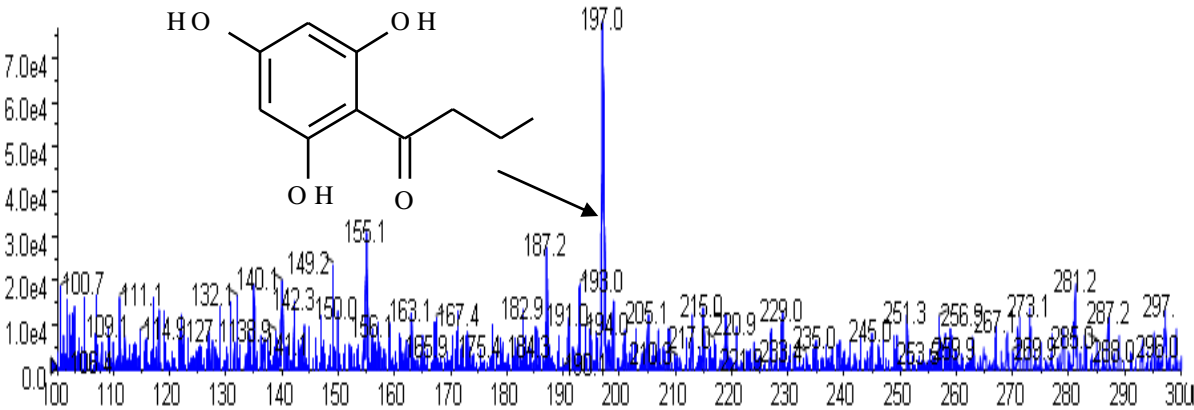


❖ 4-Hydroxy-6-isobutyl-pyran-2-on (m/z: 169)

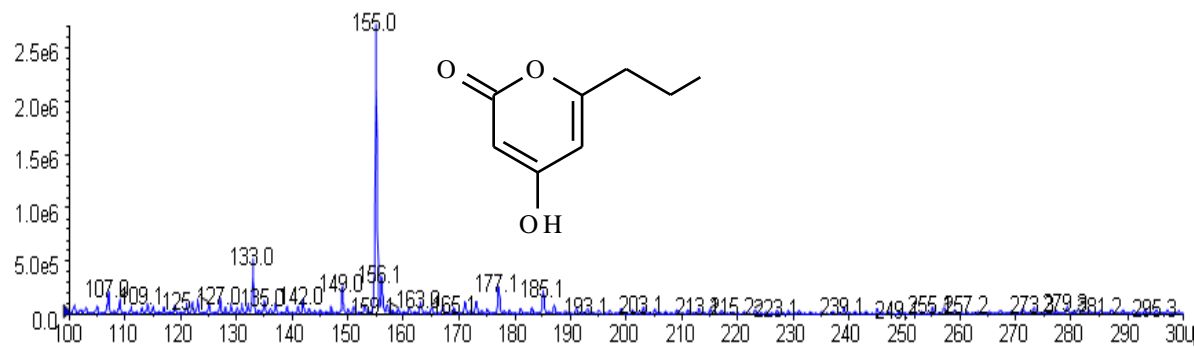


d)

❖ Phlorbutyrophenon (m/z: 197)



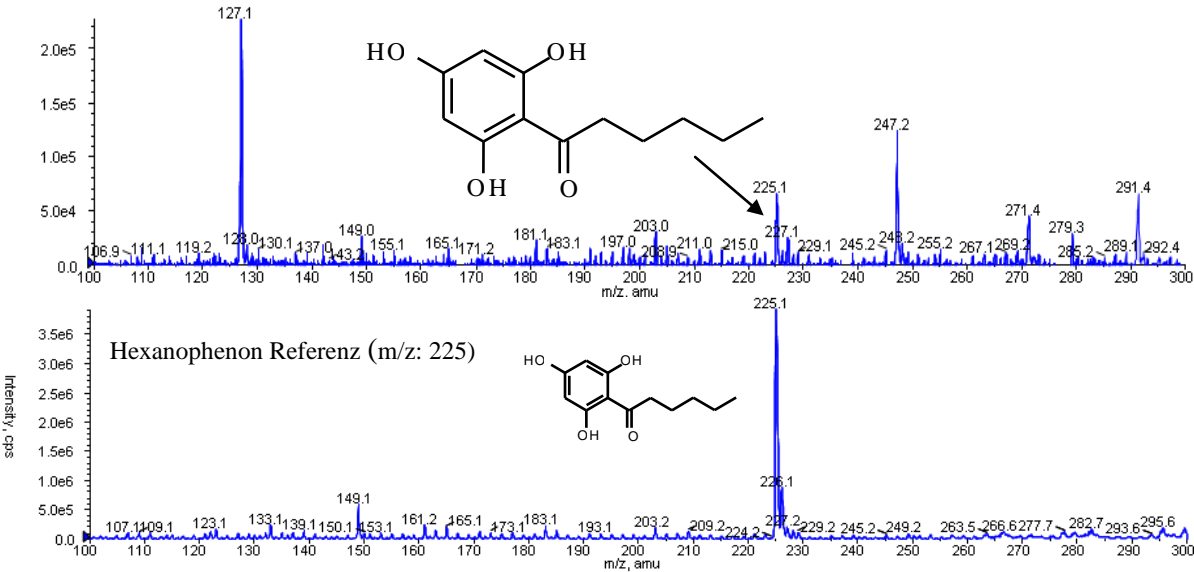
❖ 4-Hydroxy-6-propyl-pyran-2-on (m/z: 155)



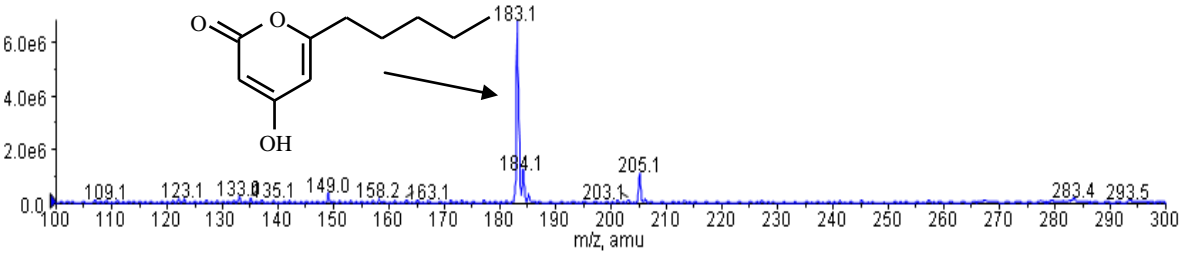


e)

❖ Hexanophenon (m/z: 225)

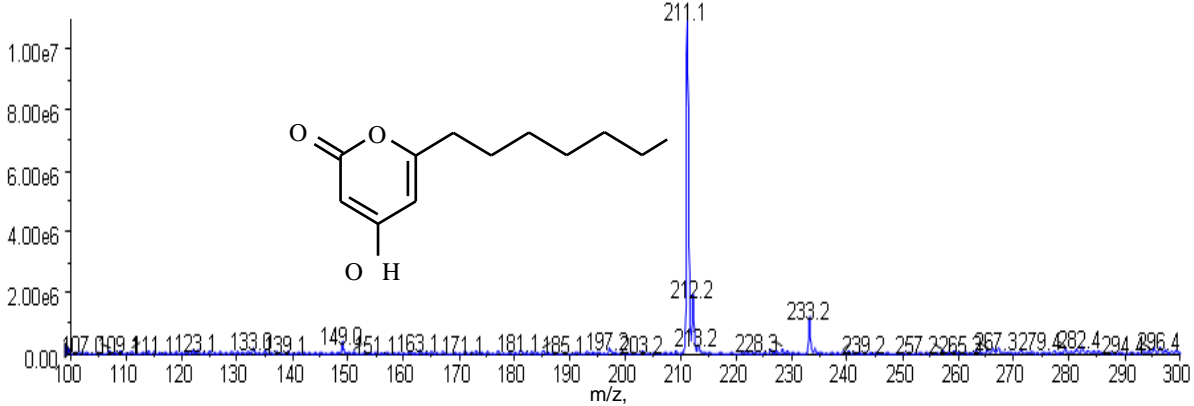


❖ 6-pentyl-4-hydroxy-pyran-2-on (m/z: 183)



f)

❖ 6-Heptyl-4-hydroxy-pyran-2-on (m/z: 211)



---